

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Biotransformación, acumulación y toxicidad de especies de selenio
Caracterización de nanopartículas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Isabel López Heras

Directoras

Carmen Cámara Rica
Yolanda Madrid Albarrán

Madrid, 2014

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**Biotransformación, Acumulación y Toxicidad
de Especies de Selenio.
Caracterización de Nanopartículas.**

Directoras:

**Dra. Carmen Cámara Rica
Dra. Yolanda Madrid Albarrán**

**María Isabel López Heras
Madrid, 2013**

Da. CARMEN CÁMARA RICA, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, y

Da. YOLANDA MADRID ALBARRÁN, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

HACEN CONSTAR QUE:

El presente trabajo, titulado “**Biotransformación, Acumulación y Toxicidad de Especies de Selenio. Caracterización de Nanopartículas**” ha sido realizado en este Departamento, bajo nuestra supervisión, por la Licenciada Da. María Isabel López Heras, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora

Madrid, 10 de Julio de 2013

Fdo.: Carmen Cámara Rica

Fdo.: Yolanda Madrid Albarrán

**Biotransformación, Acumulación y Toxicidad de Especies de Selenio.
Caracterización de Nanopartículas.**

ÍNDICE

INDICE

SUMMARY	8
Introduction	9
Selenium: Essential Element	9
Inorganic Nanoparticles: Selenium Nanoparticles and Titanium Dioxide Nanoparticles	11
Objetives	12
Results and Discussion	14
Bioaccumulation and Biotransformation of Selenium in Plants	14
Bioaccumulation and Biotransformation of Selenium in Fish	16
(Bio) Analytical methodologies focused on the Evaluation of Biological Effects of NPs, and Optimization of Analytical Strategies to NPs Characterization and Quantification	18
Conclusions	22
PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA	24
INTRODUCCIÓN	28
I. Selenio: Elemento Esencial	29
I.1. Factor Clave en la Esencialidad del Selenio: Selenoproteínas	30
I.2. Implicaciones Biológicas de las Especies Químicas de Selenio	33
I.2.1. Efecto Protector.....	33
I.2.2. Efecto Anticancerígeno.....	34
I.2.3. Toxicidad.....	36
Efecto de la Deficiencia de Selenio.....	36
Efecto de los Elevados Niveles de Selenio: Selenosis.....	37
I.3. Distribución de Selenio en el Medio Ambiente	38
I.3.1. Bioacumulación y Biotransformación de Selenio en Plantas	39
I.3.2. Bioacumulación y Biotransformación de Selenio en Pescados	42
I.4. Desarrollo de Alimentos Funcionales	44
I.4.1. Procesos de Enriquecimiento con Selenio: Biofortificación	45

I.5. Metodologías Analíticas para la Determinación de Selenio y sus Especies en Muestras Biológicas.....	48
I.5.1. Procedimientos de Tratamiento de Muestras	48
Determinación del Contenido de Selenio	49
Extracción de Especies de Selenio.....	50
I.5.2. Separación e Identificación de Especies de Selenio	53
Técnicas Hifenadas: Métodos Cromatográficos Acoplados a la Espectrometría de Masas.....	53
Técnicas Moleculares	56
I.5.3. Problemática y Validación de los Resultados en Especiación de Selenio.....	57
I.6. Referencias Bibliográficas	59
II. Nanopartículas Inorgánicas. Nanopartículas de Selenio y Nanopartículas de Dióxido de Titanio	67
II.1. Aplicaciones de las Nanopartículas	68
II.2. Impacto de las Nanopartículas en Diferentes Áreas de Interés Científico ..	72
II.3. Nanopartículas de Selenio	74
II.3.1. Aplicaciones de las Nanopartículas de Selenio	75
II.3.2. Reactividad de las Nanopartículas de Selenio: Métodos de Síntesis y Estabilización de las Dispersiones	75
II.3.3. Efectos Biológicos de las Nanopartículas de Selenio: Citotoxicidad, Ecotoxicidad y Fitotoxicidad	78
II.4. Nanopartículas de Dióxido de Titanio	81
II.3.1. Aplicaciones de las Nanopartículas de Dióxido de Titanio	83
II.3.2. Reactividad de las Nanopartículas de Dióxido de Titanio: Métodos de Síntesis y Estabilización de las Dispersiones	84
II.3.3. Efectos Biológicos de las Nanopartículas de Dióxido de Titanio: Citotoxicidad, Ecotoxicidad y Fitotoxicidad	88
II.5. Metodologías Analíticas Empleadas en el Análisis Cualitativo y Cuantitativo de las Nanopartículas Inorgánicas	92
II.5.1. Análisis Cualitativo: Caracterización y Detección de las Nanopartículas	92
Microscopía Electrónica	93
Técnicas Basadas en la Dispersión de Luz	95
Técnicas Espectrofotométricas	95

II.5.2. Análisis Cuantitativo de las Nanopartículas	95
Técnicas de Análisis Elemental	97
Métodos de Separación: Filtración y Centrifugación	98
Técnicas Hifenadas	100
II.6. Metodologías (Bio)Analíticas Empleadas en la Evaluación de los Efectos Biológicos Asociados a la Presencia de Nanopartículas Inorgánicas	104
II.6.1. Ensayos Espectrofotométricos	105
Medida de la Viabilidad Celular	105
Evaluación del Estrés Oxidativo	105
II.6.2. Técnicas Microscópicas.....	107
II.6.3. Técnicas de Análisis Elemental	109
II.6.4. Técnicas de Análisis Celular. Citometría de Flujo	109
Distribución de Fases del Ciclo Celular	109
Medida del Grado de Apoptosis	110
II.6.5. Proteómica Cuantitativa	112
Cuantificación de Proteínas basada en el Marcaje Isotópico y la Espectrometría de Masas	112
Herramientas Informáticas usadas para la Identificación de Proteínas	119
II.7. Referencias Bibliográficas	121
OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	133
PARTE EXPERIMENTAL	137
Capítulo I. Estudios de Bioacumulación y Biotransformación de Selenio en Plantas	138
I.1. Biofortificación Agronómica de Brassica con Selenio. Suplementación de SeMet y su Identificación en Semillas y Harinas de Colza Desgrasadas de <i>Brassica</i>	140
I.2. Dinámicas de la asimilación de Selenio y Metabolismo de Especies de Selenio Orgánicas en Hojas y Semillas de <i>Brassica napus L</i>	152
Capítulo II. Estudios de Bioacumulación y Biotransformación de Selenio en Pescados	188

II.1. Niveles de Arsénico, Mercurio y Selenio en <i>Clarias gariepinus</i> procedentes del Rio Sagua la Grande, Cuba	190
II.2. Identificación de Compuestos de Selenio en Músculo de Pescado mediante LC-ICPMS. Determinación de SeMet en Músculo de Pescado mediante Dilución Isotópica de Especies Específica “ <i>exact matching</i> ” LC-ICPMS	198
Capítulo III. Selenoproteínas	222
III.1. Selenoproteínas: El Factor Clave en la Esencialidad del Selenio. Estado de las Técnicas Analíticas más Avanzadas para el Estudio de las Selenoproteínas	223
Capítulo IV. Desarrollo de metodologías enfocadas a la evaluación de los efectos asociados a la presencia de nanopartículas, y a la optimización de estrategias analíticas para su caracterización y cuantificación	234
IV.1. Estrategias Bioanalíticas para Evaluar la Toxicidad de las Nanopartículas Metálicas	236
IV.2. Las Nanopartículas de Selenio inhiben el carácter invasivo de las células de hepatocarcinoma humano y bloquean su ciclo celular a través del complejo eIF	252
IV.3. Posibilidades y Dificultades en el Análisis de Nanopartículas de TiO ₂ en Productos Cosméticos y Alimenticios mediante Fraccionamiento en Flujo con Campo de Flujo Asimétrico Acoplado a Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo	282
DISCUSIÓN INTEGRADORA	312
CONCLUSIONES	333
ANEXO I. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN RELACIONADOS CON LA TESIS. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS ENFOCADAS AL TRATAMIENTO DE MUESTRA	336
Método para una Rápida Extracción y Especiación de Mercurio, empleando una micro-Sonda de Ultrasonidos seguido de LC-ICP-MS	338
ANEXO II. GLOSARIO DE TÉRMINOS	345

**Biotransformación, Acumulación y Toxicidad de Especies de Selenio.
Caracterización de Nanopartículas.**

SUMMARY

SUMMARY

INTRODUCTION

Selenium: Essential Element

Selenium (Se) is an essential element for human health. It has been recognized as antioxidant and its presence is related with reduction of certain types of cancer and other diseases. Se can be incorporated into proteins within the amino acid SeCys. These proteins, called selenoproteins, exert vital functions in the body: 1) they are essential antioxidant enzymes that fight cancer and other chemical toxicities, 2) they act as thyroid hormone regulators and thyroid function, 3) structural proteins in sperm required for fertility, and 4) they can reduce the virulence associated with certain viral infections including HIV-1.

The concentration range in which selenium is considered toxic or essential is very narrow. It has been estimated that the ingestion of foodstuffs with a Se content above 1 $\mu\text{g}/\text{Se g}$ can induce toxicity, meanwhile a concentration below 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ leads to deficient status. Because of this, studies focused on bioaccumulation, biotransformation and bioavailability of Se have attracted the interest of the analytical chemistry community.

Se is mainly circulated to the food chain via crop plants and feed, and it is known that Se concentrations are dependent on the concentration of this element in the soil. The content of Se in diets of several regions of the World has been estimated insufficient to reach the correct activity of certain selenoenzymes. This fact justifies the growth interest in the production of Se enriched food and nutritional supplements. Vegetables are one of the main Se sources in the diet of human and animals. For a wide variety of plants, agronomic biofortification has been successfully applied in order to increase the daily Se intake in areas where the agricultural soils are low in Se.

Fish and shellfish are rich in Se, although the levels of Se vary depending on fish species. Fish can take up Se directly from the water and/or by eating other marine species and phytoplankton through the food chain. It is very important to remark that to adequately establish the risks of Se consumption or supplementation, knowledge of the different chemical forms is extremely needed. In this term, the necessity to develop new analytical methodologies for Se species identification and quantification in biological matrix is still being an important issue.

It is known that hyphenated techniques based on the coupling of the chromatography mechanism to a sensitive detector (inductive coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), inductive coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) or atomic absorption spectrometry (AAS)) constitute a useful tool to identify and quantify Se species in biological samples. Whereas size exclusion chromatography (SEC) has been very used in the separation of Se-containing proteins, other chromatographic mechanisms such as high-performance liquid chromatography (HPLC) have allowed the identification of low-molecular-weight Se compounds.

Before the chromatographic separation, the species must be extracted from the solid samples where identification and determination of the selenium species is intended. This is the first stage of the analytical process, and the selected methods must be suitable to prevent species interconversion. In the case of Se, enzymatic hydrolysis by using non-specific proteases is the most common method, since it offers the advantages of mild conditions and selectivity. The combination of different analytical methodologies and chromatographic techniques is crucial to achieve an unambiguous Se-species identification. Additionally, isotope dilution analysis combined with mass spectrometry is considered an excellent alternative to quantitative elemental speciation. This technique does not only allow a precise quantification

of species but it is also able to correct the possible transformation or degradation of species during sample treatment.

Inorganic Nanoparticles: Selenium Nanoparticles and Titanium Dioxide Nanoparticles

Nanomaterials (NMs) are commonly regarded as materials with at least one dimension below 100 nm. They include nanofilms and coatings (< 100 nm in 1 dimension), nanotubes and wires (< 100 nm in 2 dimensions) and nanoparticles (< 100 nm in 3 dimensions). Nanoparticles (NPs) can occur naturally (e.g. in ashes, as soil particles or bio molecules), be produced unintentionally (e.g. in Diesel exhausts) or be intentionally engineered.

As a consequence of their size, NPs show different physic-chemical properties compared to their respective bulk material. These include changes in optical properties, thermal behavior, material strength, solubility, conductivity and (photo) catalytic activity.

Currently, the presence of NMs is becoming common in a wide range of products and sectors including medicine, cosmetics, clothing, engineering, electronics, and food. Given the increasing use of NPs, key questions concerning the new risks should be considered. Although many toxicological studies have been performed, there is still some controversy on the mechanisms involved in NPs-induced genotoxicity and carcinogenicity.

The present Doctoral Thesis is focused on Se NPs and TiO₂ NPs. As it has been mentioned before, Se is one of the essential trace elements in the body because of its antioxidative as well as pro-oxidative effect, and has great importance in nutrition and medicine. Se occurs in a variety of oxidation states, like selenite, selenite, oxyanions, selenide and elemental selenium. This latter in a nanometric size is known as Se NPs. This type of NPs is attracting increasing attention on account of their excellent biological activities and low toxicity.

On the other hand, TiO₂ is a semiconductor with several applications such as pigments, optical filters, antireflection coatings, chemical sensors, catalysts, and sterilization materials. The crystal forms of TiO₂ are anatase, rutile, and brookite. The size and shape of the TiO₂ particles have a strong influence on their functional properties, specific surface area, phase transition temperatures, and stability of the different phases. Besides of the applications cited above, TiO₂ NPs are frequently used as additives and glidants (“anti-caking agents”) in the food industry, and are also included in sunscreens and cosmetics products due to their protective skills against UV radiation.

Knowledge on size, shape, surface area, aggregation state, charge, chemistry, and reactivity of NPs is essential when evaluating their toxicity and behavior. To obtain correct information on the physical and chemical properties of NPs, reliable quantitative methods of analysis are needed. A wide range of analytical techniques such as microscopy, chromatography, centrifugation and filtration, spectroscopic, and other related methods have been used for various purposes: characterization of particle size, morphology and aggregation state, chemical characterization, and surface chemical analysis. The use of separation techniques such as liquid chromatography or field flow fraction are very promising approaches in this field. This latter is an emergent technique for size separation of natural and inorganic NPs. The UV detector is the most common system used in combination with FFF, but this separation technique can be coupled to a range of sensitive and multi-element detectors such as multi-angle laser light scattering (MALLS) and mass spectrometers (ICPMS).

Finally, in order to evaluate the biological effects and the mechanisms involved in NPs-alive organism interaction, different bio-analytical techniques are available. Some of most common techniques are: spectrophometric assays, microscopy, flow cytometry, and proteomic tools.

OBJETIVES

The main goals of this work are focused on evaluation of Se bioaccumulation and biotransformation processes in biological samples, and on the biological effects of a “special” Se compound: Se NPs. Following this research line, and given the increasing use of nanotechnology, the development of a suitable analytical methodology for characterizing and quantifying NPs in consumer products was the last target.

The individual goals are detailed as follows:

1. Study of agronomic biofortification with Se of *Brassica rapa* and *Brassica napus* species to increase nutritional quality of meal, which is an important protein source in ruminant diets.

- 1.1. Evaluation of Se uptake and biotransformation capability of both species
- 1.2. Study of biofortification effects on plants growth
- 1.3. Study of possible detoxification mechanisms

2. Determination of Se, Hg, and As levels in *Clarias gariepinus* in order to evaluate a possible risk of environmental pollution.

3. Due to the high Se concentrations reported during the previous objective, it was necessary to carry out the identification and quantification of selenocompounds in *Clarias gariepinus*.

3.1. Optimization of a quantitative Se species extraction based on the use of enzymatic hydrolysis and different analytical methodologies

3.2. Accuracy quantification of SeMet by using (ID) LC-IPC-MS

4. Validation of results using different analytical methodologies and techniques based on enzymatic extraction protocols, several chromatographic separation mechanisms and reference certified materials.

5. Evaluation of biological effects involved in NPs-hepatic cells interaction.

5.1. Study of cell viability

5.2. Cellular uptake and NPs localization within cells

5.3. Identification of de-regulated proteins using a quantitative proteomic tool based on metabolic labeling of proteins (SILAC) and mass spectrometry (ESI-MS/MS)

6. Characterization and quantification of TiO₂ NPs in cosmetic products by AF-FFF-UV/ICP-MS.

6.1. To Develop a straightforward calibration method using NPs standards

7. Besides of the different goals proposed, during the development of this Doctoral Thesis a personal and professional training has been achieved by performing scientific activities such as: collaboration in additional research projects, elaboration of reviews about scientific interest issues, published articles, meetings and conferences, training courses, supervision of other students, etc...

RESULTS and DISCUSSION

The different research projects presented in this report have a dual purpose: on one hand, Se bioaccumulation and biotransformation studies have been carried out in biological matrix (plants and fish) with the aim of improving their nutritional properties, and evaluating the possible toxic effects associated to consumption of these samples. On the other hand, issues related to the lack of information about biological effects of Se NPs have been dealt with. The obtained results have been used to insight into mechanisms involved in NPs-cells interaction.

At the same time, and given the increasing use of NPs in consumer products, a research project based on the development of an analytical methodology to characterize and quantify NPs has been performed to complete this investigation.

The results are briefly discussed below:

1. Bioaccumulation and Biotransformation of Selenium in Plants

“Agronomic biofortification of *Brassica* with selenium-enrichment of SeMet and its identification in *Brassica* seeds and meal”

Selenium, as previously commented, is an essential micronutrient and is circulated to the food chain through crops. *Brassica* species are efficient in Se accumulation and thus, good species for Se biofortification purposes. The residual fraction obtained after oil processing of *Brassica* seeds, the meal, is an important protein source in animal diets and used in feed concentrates. The accumulation of soil or foliar applied Se in the seeds and meal of *Brassica napus* and *Brassica rapa* as well as its effects on growth and yield formation was studied. There is increasing evidence that Se can have beneficial effects on the growth, yield formation and stress tolerance of several plants. However, in our work, Se application did not affect the yield or oil content. On the contrary, the plant morphology was affected. In the Se-treated *Brassica rapa*, more siliques tended to be formed in the main branch rather than in side branches. This indicated that the availability or distribution of carbohydrates within the plant could be altered.

Regarding the bioaccumulation capability of these species, high levels of Se in the tested seeds and meal (1.92-1.96 µg/g) was detected after biofortification treatments.

Biotransformation of inorganic Se was evaluated by using LC-ICP-MS previous enzymatic hydrolysis for species extraction. Se speciation showed that up to 85% of the total Se was

SeMet whereas other Se-species were not detected. This percentage was the same as that in the selenised yeast used in feed additives. The dominance of SeMet as the main Se species in both meal and seeds implied that processing of *Brassica* seed to defatted meal does not alter the SeMet originally present in seeds. The use of enzymatic probe sonication allowed quantitative extraction of Se species in a short period of time (2 min). It is known that the action of ultrasound enhances the cleavage of proteins and complex structures. Because of this, it has been successfully applied for samples as diverse as vegetables, meat and selenized yeast. No differences were observed in the chromatographic profiles when comparing the enzymatic hydrolysis using either control temperature incubator or ultrasonic probe showing that the use of the ultrasonic probe not only allowed quantitative extraction of species but also prevented species transformation.

“The dynamics of selenium uptake and metabolism of organic selenium species in the leaves and seeds of *Brassica napus* L. “

Selenium is converted in plants from inorganic Se to various organic Se compounds via sulphur (S) assimilation pathway. In Se hyperaccumulators plants, the synthesis of non-protein Se amino acids such as anti-carcinogenic selenomethyl selenocysteine (SeMeSeCys) is a key tolerance mechanism preventing the incorporation of Se in proteins. In this work, we studied the capability of *Brassica napus* to synthesize organic Se species from inorganic selenate/selenite (SeVI/SeIV) as a detoxification mechanism.

It is known that Se concentrations above certain threshold can cause growth reduction in plants without any symptoms of toxicity. The threshold for dry mass reduction is dependent on plant species, chemical form of applied Se as well as on the availability of S in growth media. In our experiment Se treatments resulted in transient reductions (from 3% to 28%) in leaf dry mass accumulation after 14 days of application when Se accumulated rapidly in plant tissue, and the biotransformation to organic compounds was activated. The growth retardation may have been due to metabolic disturbance caused by the rapid accumulation of inorganic Se and conversion to organic compounds such as SeMet.

Activation of APS 1-3 and SMT gene homologues were monitored concomitantly with the accumulation of organic Se-species 6 h, 7d and 14 d after Se application to follow the kinetics of Se metabolism. After 6 hours a 2-fold increase in transcript levels was detected together with accumulation of selenomethionine (SeMet)(15 %) and SeMeSeCys (4 %). After 14 d, an

amount of 33 $\mu\text{g Se/g}$ was accumulated, 33 % as SeMet and 60 % as Se(VI), whereas SeMeSeCys was no further detected. SeMet was the main organic Se compound (53 to 94 %) detected in seeds and protein-rich meal.

A high expression of SMT gene detected in hyperaccumulators such as *A. bisulcatus* and *S. pinnata* was related to an elevated accumulation of non-protein SeMeSeCys and MeCys. Therefore, the SMT enzyme activity is directly involved in Se tolerance pathway. Analysis on the putative *Brassica napus* SMT protein sequence revealed a substitution typical for non-accumulators (Ala-184 Thr substitution) and may explain the low SeMeSeCys accumulation in *Brassica napus*. Selenium seems to activate the synthesis of nutritionally valuable SeMeSeCys in *Brassica napus*, but the capacity of this Se detoxification pathway is limited. Thus, the absence of SeMeSeCys in the seeds may not be due to poor translocation from leaves but rather explained by low level of synthesis accompanied probably with rapid volatilization of methylated Se compounds.

2. Bioaccumulation y Biotransformation of Selenium in Fish

“Levels of arsenic, mercury and selenium in *Clarias gariepinus* from Sagua la Grande River, Cuba”

This study reports the concentrations of mercury (Hg) arsenic (As) and selenium (Se) in fish tissue of *Clarias gariepinus* from Sagua la Grande River in the Villa Clara Province, Cuba. Individuals were captured in three areas near Sagua la Grande City, where this fish is a common source of food for the city inhabitants. Concentrations range of As and Hg were lower than the recommended maximum concentration by the Cuban standard for fish consumption in all samples, and in the same order of magnitude that the reported by other authors in freshwater fish. However, Se concentrations in fillets of *Clarias gariepinus* were between 2.3 and 15.5 $\mu\text{g/g}$. It was noted that these levels were higher than the average values reported for other freshwater fish. Average levels of Se in fillet between 0.21 and 0.64 $\mu\text{g/g}$ for various species, in the Savannah River were found- A 31.6 % of individuals captured exceeded the threshold value for Se toxicity, which means that Se is likely to produce adverse consequences on the fish themselves or on the wildlife organisms that eat them.

“Screening of Se-compounds in fish muscle by LC-ICPMS. SeMet determination in fish muscle by ‘exact matching’ species specific isotopic dilution LC-ICPMS”

The high Se levels found in muscle of *Clarias gariepinus* turned this sample in an interesting matrix to carry out selenium speciation studies. These studies in fish tissues are very scarce and in most of them mass balance data are not quantitative or included. In this study, several sample treatments for Se-species extraction based on enzymatic hydrolysis and different methodologies (microwave assisted extraction, ultrasonic probe assisted extraction and incubation at controlled temperature) were compared for identification and quantification of Se-compounds in *Clarias gariepinus* muscle using LC-ICP-MS- based techniques. Se-species were quantitatively extracted by using enzymatic probe sonication with pronase E. It was noted that the effect of pronase E is largely influenced by the nature of the extracting media employed. In this respect the extraction efficiencies obtained were higher when 2.5:1 sample/pronase E ratio was added to 7 M urea solution in comparison with the use of phosphate buffer solution. Generally, Se in biological samples is bound to proteins and peptides, with the consequent need for cleavage of these structures in order to obtain a quantitative extraction. Because of this, urea was added to Tris-HCl buffer solution since it is usually employed as denaturing agent in protein extraction protocols.

As a step further, the effect of urea concentration on selenium efficiency was investigated as high urea concentrations may have a negative effect on enzymatic activity. In this study, the use of urea solution in extracting media was evaluated by testing two concentrations: 1 M and 7M. The conclusions cited above led us to consider the development of a two-steps enzymatic protocol. First, a 7 M urea solution in Tris-HCl buffer solution at pH 7.5 was added to sample in order to denature protein structure, and sonication of the mixture for 2 min at 40% of ultrasound amplitude was performed (step 1). Then, enzymatic hydrolysis with pronase E (2.5:1 sample/enzyme ratio) was carried out, being necessary the dilution of urea concentration to 1 M (step 2). These results indicate that the use of an appropriately urea concentration can improve outstandingly the selenium extraction.

The methodology based on the use of ultrasonic probe was chosen to perform Se extraction from fish muscle samples due to the high extraction efficiency achieved (91±2%) and the significant decrease in the extraction time (4 minutes versus 30 minutes and 24 hours for MAEE and incubation, respectively). Another important aspect that should be considered in the optimization of extraction methodology is the risk of selenium species interconversion. In

this term, no changes in chemical form of selenium were observed after analysis of enzymatic extracts obtained by different methodologies by (AE) LC-ICP-MS.

Screening of Se-compounds in the proteolytic extracts was performed by SEC-ICP-MS. Selenium appeared associated to two fraction of low molecular weight (5KDa and 0.1 KDa) with the second peak matching at the retention time of SeMet. The recovery of SEC chromatography step was around 100-98%. However, low Se recoveries (30%) were obtained when analyzing the proteolytic extracts by (RP) LC-ICPMS and (AE) LC-ICPMS, being only SeMet quantitatively chromatographic recovered. In order to improve chromatographic recovery, fractions of SEC peaks were collected and submitted to a second enzymatic hydrolysis and then introduced to a PRP X-100 column coupled to ICP-MS. No significant improvement in recovery was obtained after a second enzymatic hydrolysis of 5KDa Se-compounds and that these corrupt the chromatographic HPLC recoveries of fish muscle samples. SeMet was quantified in the fish muscle by using 'exact matching' species specific isotopic dilution (ID) LC-ICP-MS. Concentrations of SeMet in two fish samples obtained by (ID) LC-ICPMS were in good agreement with those obtained by standard addition LC-ICP-MS. To the best of our knowledge, this is first application of species specific isotope dilution for the accurate and precise determination of SeMet in fish tissues.

3. (Bio) Analytical methodologies focused on the Evaluation of NPs Biological Effects, and Optimization of Analytical Strategies to NPs Characterization and Quantification

"Selenium nanoparticles inhibit in-vitro invasiveness and induce eIF3-mediated cell cycle arrest"

Se-species such as SeMeSeCys or SeMet have been proposed as protective agents against cancer in many studies. Although the mechanism of its anticarcinogenic action is not yet fully understood, it is clear that the chemical form and the concentration in which Se is administered, is crucial. Currently, Se NPs are receiving an increasing attention because of their antioxidant activities and low toxicity in comparison with former organic Se-compounds mentioned.

Se NPs were synthesized by employing chitosan (CS) polysaccharide as modifier agent. Previous studies have demonstrated the capability of monosaccharides (glucose), oligosaccharides (sucrose) and polysaccharides (CS) to modify the Se NPs regarding to their diameter, morphology and stability in the liquid dispersions. Moreover, it has been reported

that CS has antioxidant properties, suppressing the ROS formation and the associated DNA damage response.

When carrying out an *in vitro* assay, it is very necessary to investigate the behavior of NPs under physiologically conditions. The trend of NPs towards high aggregation states or oxidation may be an important issue for future applications. In our study, the size of Se NPs kept unchanged (40-60 nm) and a low percentage (< 0.1%) was found in form of ionic Se during storage. These results indicated that synthesized Se NPs were stable at least for 1 month.

Flow cytometry and cell viability assays revealed that Se NPs were able to inhibit cell proliferation, in a concentration-dependent manner, by arresting cell cycle of HepG2 cells in S phase. In this phase of cell cycle mainly protein synthesis takes place.

NPs internalization within cells is a potentially important factor for understanding the biological mechanisms in which they are involved. TEM analysis and determination of total Se content by ICP-MS in cells and culture media pointed out that a low percentage of Se NPs were uptaken and accumulated in the cells. Se NPs were detected into vacuoles and also distributed throughout the cytoplasm of HepG2 cells around the internal side of plasma membrane. Moreover, TEM images showed a higher vacuolization and indicated the presence of Se NPs in subcellular organelles, such as mitochondria and endoplasmic reticulum (ER). These organelles play an important role in a range of processes, such as cellular energy supplying, cellular differentiation and apoptosis. The ER is considered as entry point for lipid biosynthesis as well as for secretory and membrane proteins. The detection of Se NPs into these organelles could be directly related with the protein synthesis inhibition induced by these.

In order to identify potential targets involved in the mechanisms responsible for this response to Se NPs, we applied a quantitative proteomic strategy based on differential stable isotopic labeling of cells (SILAC) in combination with biological mass spectrometry. The proteomic approach allowed the identification of an important number of de-regulated proteins involved in the following network functions: cell growth, cell proliferation, protein synthesis, protein degradation, DNA replication, recombination and repair, nucleic acid metabolism, post-translational modification and cellular death. Among all the de-regulated proteins, eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) received a special attention. This protein complex is coordinated through several eIF3 subunits and is considered the largest of the initiation factors involved in the regulation of protein synthesis and protein degradation.

Our study revealed the over-expression and the down-expression of different eIF3 subunits related to oncogenic activity.

Immunoblotting and immunofluorescence analysis corroborated the hypothesis that eIF3 complex expression was directly involved in pathway through which Se NPs exerted an inhibitory effect on protein synthesis and cell growth.

In vitro invasion assays, in which HepG2 cells treated with Se NPs were grown in an extracellular matrix, revealed a remarkable effect of NPs on the invasive ability of these cells in a dose-dependent manner.

Altogether, our findings suggested that Se NPs at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose could play a pivotal role in therapeutic treatments.

“Prospects and Difficulties in TiO_2 Nanoparticles Analysis in Cosmetic and Food Products Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Hyphenated to an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”

The characterization and quantification of TiO_2 NPs in cosmetic products and foodstuffs based on asymmetrical flow-field flow fractionation combined to an inductively coupled plasma mass spectrometry (AF^4 -ICPMS) have been performed.

For efficient size-based separations and high NPs recoveries, it is necessary to optimize the parameters that affect their elution. The separation of NPs is directly affected by instrumental parameters (spacer dimensions and membrane characteristics; material and cut-offs), carrier solution composition (ionic strength, use of surfactants, and pH values), and separation conditions (injection/focusing time, cross flow rate, and injected volume). In our work, AF^4 -ICPMS separation of TiO_2 NPs was performed using 0.2% SDS, 6% methanol at pH 8.7 as the carrier solution. The use of surfactant agents in carrier solutions stabilizes NPs by an electrostatic mechanism, and therefore improves the separation of NPs. However, they can also negatively affect the efficiency of nebulization when AF^4 is combined with ICPMS. To prevent this negative effect, methanol (6% v/v) was added to the carrier solution. It has been reported that the use of organic may prevent NPs TiO_2 NPs aggregation, improving the resolution of the fractograms.

When developing a method based on AF^4 separation, cross flow is one of the main parameters controlling the distribution of particles through the membrane and consequently their separation. By applying a 0.5 mL/min cross flow rate and a 30 min gradient time, the peak

corresponding to residual NPs disappeared and the NPs eluted within a range of 15-32 min (showing a broad peak in the fractogram due to its high aggregation).

Two problems were addressed during TiO₂ NPs analysis by AF⁴-ICPMS: size distribution determination and quantification of the NPs. NPs size determination is a key factor to understand their distribution in biological systems and their correlation with toxicity. To date, obtaining adequate information on NPs sizes is still an important issue in AF⁴ analyses. Two approaches were used for size determination: size calibration using polystyrene latex standards of known sizes and transmission electron microscopy (TEM). The ability of these NPs to form aggregates provided erroneous information regarding their size distribution, and TEM was necessary to validate the results.

As it has been commented before, considerable attention was given to quantify TiO₂ NPs in this work. A method based on focused sonication for preparing NPs dispersions followed by an online external calibration strategy based on AF⁴-ICP-MS, using rutile TiO₂ NPs as standards is presented here for first time. The use of the ultrasonic probe (at 40% ultrasound amplitude, for 2 min) increased NPs recovery from the AF⁴ system, improved the reproducibility, and a successful linear response (peak areas vs injected amount) was achieved. The developed method allowed suppressing NPs-membrane non-specific interactions and overcome erroneous results when quantifying by addition of ionic Ti solutions.

Regarding validation, at the 95% confidence level, no significant differences were detected between Ti concentrations in the moisturizing cream prior sample mineralization (3865 ± 139 mg Ti/kg sample), by FIA-ICPMS analysis prior NPs extraction (3770 ± 24 mg Ti/kg sample), and after using the optimized online calibration approach (3699 ± 145 mg Ti/kg sample). Besides the high Ti content found in the studied food products (sugar glass and coffee cream), TiO₂ NPs were not detected.

CONCLUSIONS

The main conclusions obtained from this research work are summarized below:

1. The **agronomic biofortification with Se** can improve the nutritional quality of *Brassica* meal and the capacity of *Brassica* species to accumulate Se. This fact gives an attractive option for **increasing the SeMet concentration of animal diets**.

2. We conclude that **Se activates S assimilation pathway rapidly in *Brassica napus***. The intensive Se uptake causes transient growth retardation, activation of Se detoxification followed by modest synthesis of a non-protein SeMeSeCys. The SMT enzyme in *Brassica napus* presented an Ala-184 Thr mutation causing a **SMT/HMT dual function** of the enzyme and this could explain the **low accumulation of SeMeSeCys**. Transient accumulation of methylated Se compounds indicated that the **volatilization of Se compounds could be activated and acts as a detoxification mechanism in *Brassica napus***.

3. **High levels of Se were found in *Clarias gariepinus* filets**. In 31.6 % of individuals Se concentrations exceeded threshold values for Se toxicity, which means that Se is likely to produce adverse consequences on the fish themselves or on the wildlife organisms that eat them. Significant differences were found for Se in fish captured in the sampling stations, probably influenced by differences in fish size at these stations.

4. Due to the high levels of Se found in fish, it is necessary to study the effect of Se in fish and the intake associated with fish consumption.

Se-extraction from fish muscle is not an easy task **requiring the use of urea** for quantitative extracting the selenium species. Moreover, the use of **focused ultrasound energy dramatically decreased the sample treatment time** compared to MAEE or bath incubation at controlled temperature. Our results strongly indicated the formation of **Se-compounds (5 kDa)** after enzymatic hydrolysis which corrupts the chromatographic recoveries of Se species. Further an accurate and precise method was described for the determination of **SeMet in fish muscle** by using by 'exact matching' species specific isotopic dilution (ID) LC-ICP-MS.

4. The results of MTT assay reported that the **Se NPs reduced cellular viability** and they had a remarkable effect on the **invasive ability of HepG2 cells in a dose-dependent manner**. TEM images showed a **massive vacuolization** in HepG2 cells and the presence of **Se NPs** in some of these vacuoles, and organelles such as **mitochondria and endoplasmic reticulum**. Flow

cytometry analysis showed on one hand that the **HepG2 cells treated with 1 ug/L Se NPs were arrested in the S phase**, and on the other hand that this fact was directly related to the **down-expression of eIF3 complex** (one of the main initiation factors involved in the synthesis and degradation of proteins). Our investigations suggested that **Se NPs may be a potential candidate as chemopreventive and chemotherapeutic agent for human cancers**.

5. A method based on an **online external calibration strategy and AF⁴-ICP-MS, using rutile TiO₂ NPs as standards**, has been successfully applied **for characterizing and quantifying of TiO₂ NPs**. Besides the optimization of the cross flow rate and carrier composition, the **ultrasound energy** methodology used in NPs stabilization was **one of the main parameters controlling fractionation efficiency**. The optimized experimental conditions provided a **complete rutile TiO₂ NPs recovery from the AF⁴ system, avoiding drawbacks due to non-specific interactions with membrane and NPs losses**. The developed online calibration method represents a **promising approach** for quantitative determination of TiO₂ NPs in consumer products **without the need of additional strategies or the use of standard calibrates of different chemical nature**.

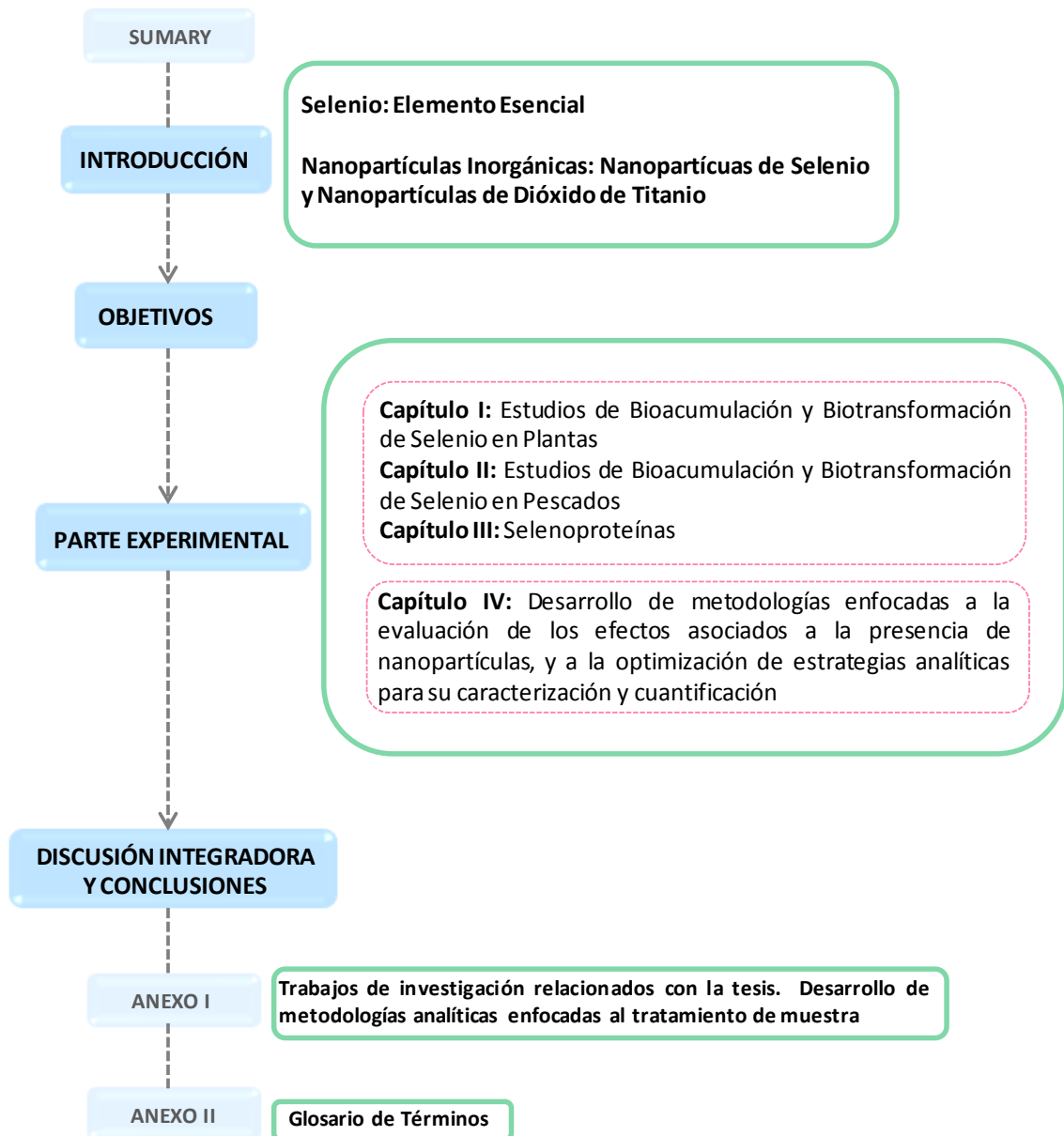
**Biotransformación, Acumulación y Toxicidad de Especies de Selenio.
Caracterización de Nanopartículas.**

PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA

PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA

La presente memoria titulada **“TITULO”** se enmarca dentro de las líneas de investigación del grupo “Determinación de Trazas, Especiación y Proteómica (TrEP)”, liderado por la Profa. Carmen Cámara Rica. Desde sus inicios, en 1982, este grupo ha participado en numerosos proyectos de investigación nacionales (Ministerio de Medio Ambiente, Ministerio de Educación y Ciencia, y Comunidad de Madrid) e internacionales (OIEA, Comunidad Europea). Entre sus líneas de investigación más importantes se encuentran: la biotransformación y biodisponibilidad de Se en alimentos enriquecidos, el desarrollo de métodos de análisis para la determinación de contaminantes emergentes, metales y nanopartículas en alimentos, muestras biológicas y medio ambientales, la aplicación de proteómica cuantitativa al análisis medioambiental, biomédico y de alimentos, y el desarrollo de bioestrategias analíticas atómicas y moleculares para la identificación de proteínas relacionadas con tratamientos terapéuticos a base de platino. Actualmente, el grupo goza de una gran solidez en la Comunidad Científica Internacional.

Esta memoria se ha estructurado en cuatro secciones principales: INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS, PARTE EXPERIMENTAL, y DISCUSIÓN INTEGRADORA Y CONCLUSIONES, tal y como aparece esquematizado a continuación:



En la **INTRODUCCIÓN** se presentan los antecedentes y cuestiones más importantes de los temas de investigación tratados durante el desarrollo de esta tesis doctoral. Esta sección se ha dividido en dos partes fundamentales:

- **Selenio.** Parte en la cual se recogen cuestiones y estudios implicados en la esencialidad de este elemento, así como en sus funciones biológicas y distribución en el medio ambiente. Además, se hace hincapié en la necesidad de desarrollar alimentos

enriquecidos en Se, y se detallan las metodologías analíticas más adecuadas para la determinación de Se y sus especies.

- **Nanopartículas Inorgánicas (nanopartículas de selenio y nanopartículas de dióxido de titanio).** En primer lugar se ofrece una visión general de las aplicaciones de las nanopartículas en diferentes sectores (tecnología, medicina, medio ambiente, alimentos, cosmética...), y de su actual impacto en diferentes áreas científicas. De una forma más detallada, se presentan las nanopartículas de Se y las nanopartículas dióxido de titanio. Al igual que en el caso anterior, en esta parte también se hace un repaso a las metodologías analíticas y bioanalíticas enfocadas a la caracterización, cuantificación y evaluación de los efectos biológicos de las nanopartículas inorgánicas.

En los **OBJETIVOS** se presentan tanto los propósitos marcados al inicio de este trabajo de investigación, como otras finalidades colaterales conseguidas durante el desarrollo del trabajo.

Cabe destacar que varios de los trabajos de investigación presentados en la **PARTE EXPERIMENTAL** son el fruto de colaboraciones entre el Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid e instituciones internacionales como: el Departamento de Biología Aplicada de la Universidad de Helsinki, y el Instituto de Ciencia y Tecnología de Ciudad de La Habana, Cuba. Esta sección se ha dividido en cinco capítulos. Los **capítulos I, y II** están relacionados con los estudios de bioacumulación y biotransformación de Se en muestras biológicas (plantas y pescados). En el **capítulo III** se presenta una revisión bibliográfica sobre las contribuciones más importantes de la química analítica para el estudio de selenoproteínas y de proteínas que contiene Se. Por otra parte, el **capítulo IV** recoge los estudios desarrollados durante la última etapa de esta tesis. Estos trabajos están enfocados tanto al desarrollo de metodologías para la evaluación de los efectos biológicos asociados a la presencia de nanopartículas, como a la optimización de estrategias analíticas para su caracterización y cuantificación. Por último, en el **ANEXO I**, y siguiendo la línea de desarrollo de metodologías analíticas, se presenta un trabajo de investigación relacionado con la presente tesis doctoral.

Además de las diferentes secciones comentadas, la presente memoria consta de un **RESUMEN (summary)**, de un **ANEXO II (glosario de términos)**, y finaliza con una **DISCUSIÓN INTEGRADORA** en la que se engloban los resultados y todas las conclusiones obtenidas tras cuatro años de intenso trabajo.

**Biotransformación, Acumulación y Toxicidad de Especies de Selenio.
Caracterización de Nanopartículas.**

INTRODUCCIÓN

I. Selenio: Elemento Esencial

30.974 arsenic 33 As	34 Se	35.453 bromine 35 Br
74.922 antimony 51	78.96 52	iodine 53

El selenio (Se) es un micronutriente esencial con importantes funciones biológicas y bioquímicas debido principalmente a sus propiedades antioxidantes y a su capacidad para regular el metabolismo de la glándula tiroidea.

Este elemento junto a otros minerales y vitaminas, constituye la principal defensa antioxidante del organismo, protegiendo células, membranas celulares y ácidos grasos contra los radicales libres. Además, aumenta la producción de glóbulos blancos, neutraliza el efecto de los metales pesados y previene las mutaciones. Se conoce que el Se ejerce un papel antagónico frente a los efectos tóxicos de muchos metales como; arsénico, cadmio, mercurio y plomo en organismos.¹⁻⁴ Los efectos beneficiosos del Se en animales aparecen recogidos por primera vez en el año 1957 por Schwarz y col. Estos autores constataron que este elemento era capaz de proteger a ratas con deficiencia en vitamina E frente a la necrosis hepática.⁵ Sin embargo, no fue hasta el año 1973 cuando se comprobó que su función biológica en animales estaba asociada a su acción reductora a través de la selenocisteína presente en la enzima glutatión peroxidasa.^{6,7}

Hasta la fecha, los estudios llevados a cabo para elucidar el metabolismo de este elemento en diversas matrices biológicas han sido numerosos. Estos estudios han demostrado que las propiedades del Se (como elemento esencial o tóxico) no solamente dependen de su

concentración, sino de su forma química. En la Tabla 1 aparecen algunos de los compuestos de Se encontrados en matrices biológicas.

Tabla 1. Algunos compuestos de Se encontrados en matrices biológicas

Especie	Fórmula Química
Selenito	SeO_4^{-2}
Seleniato	SeO_3^{-2}
Seleniuro de hidrógeno	H_2Se
Metilselenol	CH_3SeH
Dimetilseleniuro	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}$
Selenocistina	$\text{CH}_3\text{SeCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$
Selenocisteína	$\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{SeSeCH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$
Trimetil selenonio	$\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{SeH}$
Selenohomocistina	$(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$
Selenocistationina	$\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SeSeCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$
Selenoetionina	$\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{SeCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$
Selenocistamina	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SeSeCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Selenoadenosilselenohocisteína	$\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SeCH}_2\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_3\text{C}_5\text{N}_4\text{NH}_2$
γ -glutamil-selenometilselenocisteína	$\text{CH}_3\text{SeCH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$
Selenometilselenocisteína	$\text{CH}_3\text{SeCH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}_2$

I.1. Factor Clave en la Esencialidad del Selenio: Selenoproteínas

El Se puede incorporarse a proteínas, a través de un enlace covalente, en forma del amino ácido selenocisteína (SeCys). Estas proteínas se denominan selenoproteínas y son las responsables de conferir a este elemento su carácter esencial. El Se también puede ser incorporado a las proteínas de forma no específica como selenometionina (SeMet). Sin embargo, estos compuestos no se consideran selenoproteínas, ya que no presentan ninguna función biológica, y se denominan proteínas que contiene Se.⁸

Las selenoproteínas se encuentran en microorganismos unicelulares (bacterias y arqueas), y en eucariotas. Sin embargo algunos organismos, como las levaduras y plantas, pierden el residuo de SeCys durante su evolución y por lo tanto no tienen selenoproteínas, pero si moléculas homologas de algunas selenoproteínas que contienen residuos de cisteína.⁹ La mayoría de las selenoproteínas se clasifican en dos grupos según la posición del residuo de SeCys en la cadena polipeptídica. En el grupo I, la SeCys está localizada en la posición N-terminal. Selenoproteínas como la glutatona peroxidasa (GPx) y la selenoproteína W pertenecen a este grupo. En el grupo II, la SeCys se encuentra en el extremo C-terminal de la secuencia péptida. La familia de la tioredoxina reductasa (TRx) pertenece a este grupo.

El número de selenoproteínas varía de manera significativa entre organismos. Mientras que los organismos acuáticos contienen un número elevado, en el proteoma de los humanos se

encuentran 25 genes conocidos como selenoproteínas: cinco GPxs, tres TRXs, tres iodotironina deiodinasa (DIOs), selenoproteína W, selenoproteína SelP, SPS2, Sep15, SelM, MsrB1, y las selenoproteínas I, N, O, H, T, K y S. La mayoría de las selenoproteínas en humanos y roedores son comunes, excepto la GPx6. En humanos esta enzima es considerada una selenoproteína, pero en roedores no, ya que el residuo de SeCys está sustituido por la Cys.¹⁰

Las selenoproteínas son 1000 veces más efectivas en catálisis que las moléculas homólogas, que contienen Cys.¹¹ El residuo de SeCys es un nucleófilo más fuerte y por lo tanto más reactivo que la Cys, lo que implica que las selenoproteínas tienen una mayor reactividad frente a los sustratos electrófilos.¹² Su mayor efectividad en catálisis es una de las principales razones por las que el Se se encuentra involucrado en tantos mecanismos presentes en la naturaleza.⁹

Como se ha mencionado anteriormente, docenas de selenoproteínas han sido descubiertas hasta el momento, sin embargo las funciones biológicas de todas ellas no han sido elucidadas.¹³ Entre las selenoproteínas más conocidas se encuentran las de las familias glutatión peroxidasa (GPx), tioredoxina reductasa (TR) y yodotironina deiodinasa (ID). En la Figura 1 aparecen esquematizadas las **funciones esenciales de las selenoproteínas** mejor caracterizadas hasta el momento.

Glutatión peroxidasa

Presenta una **función antioxidante** en las células. Actúan como catalizadores en la reducción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG)

GPx1

Es la proteína más abundante en los mamíferos. Se encuentra en el citosol de todas las células y su actividad es regulada en el hígado.¹⁴

GPx2

Protección de la toxicidad de hidroperóxidos lipídicos ingeridos y se expresa principalmente en el tracto gastrointestinal.¹⁵

GPx3

La segunda proteína más abundante en el plasma sanguíneo.¹⁴ También se ha encontrado en leche materna.¹⁶ Se encuentra en el exterior de la célula.¹⁷

GPx4

Reduce específicamente ácidos grasos hidroperóxidos que son esterificados a fosfolípidos.¹⁸ Otra función atribuida a esta enzima es la reducción de hidroperóxidos y ésteres del colesterol en membranas y lipoproteínas de baja densidad.¹⁹

Figura 1. Clasificación de las selenoproteínas y sus funciones biológicas.

Tiorredoxina reductasa

Esta enzima se encuentra en los tejidos de todos los órganos, piel y tiroides. Su **función** es la degradación de peróxidos fuera de las membranas celulares, **contribuyendo a la homeostasis redox celular**.²⁰ También está implicada en el crecimiento celular y en la recuperación del estrés oxidativo.²¹

Yodotiroina deyodinasas

En general, su **función biológica** es **endocrina**, mediante la regulación del nivel de la forma activa de la hormona tiroidea 3,3'-5-triyodotironina (T3).^{22,23}

ID tipo1

La primera selenoproteína en la que se observó la inserción de SeCys mediante el triplete UGA.²⁴ Ésta se encuentra fundamentalmente en la glándula tiroidea, aunque también en tejidos de riñón e hígado.^{25,26}

ID tipo2

Tiene como función principal la producción de T3 intracelular²² y se halla en la glándula pituitaria, sistema nervioso central, placenta y tejido adiposo (en humanos y ratas), como también en la glándula tiroidea y músculo cardíaco de humanos.

ID tipo3

Se localiza en el cerebro, piel y placenta y es la responsable de la degradación de la forma activa de la hormona tiroidea, dando lugar a otras especies inactivas.²⁵

Selenoproteína P

Selenoproteína mayoritaria en el plasma sanguíneo de los mamíferos. Algunos autores sugieren que esta selenoproteína se encarga del **transporte de SeCys a distintos órganos**.⁶ Otra de las funciones que se le atribuyen es la de **antioxidante del sistema vascular**¹³ y de las **membranas celulares**.²⁹

Selenofosfato sintetasa

Identificada en humanos en dos formas: **Sp1** y **Sp2**, pero sólo la segunda es una selenoproteína. Su principal función es **catalizar la producción de selenofosfato**, el cual es un dador de Se en las reacciones metabólicas necesarias para la biosíntesis de selenoproteínas.²⁸

Selenoproteína de 15 kDa

Esta proteína ha sido identificada en una gran variedad de tejidos, principalmente en la próstata y tiroides de humanos y ratones. Contiene un único residuo de SeCys en el centro de la cadena peptídica y su **función biológica** aunque desconocida, se **relaciona con la protección anticancerígena de las células secretoras**.¹³

Selenoproteína de 18 kDa

Se encuentra en la membrana mitocondrial de tejidos como el riñón, hígado o cerebro. Su **función biológica** aún **no ha sido elucidada** pero se **relaciona** con el **sistema endocrino** dado que en estados carenciales de Se se sintetiza de forma preferente en los órganos de dicho sistema.²⁹ Es preservada en estados deficientes de Se.³⁰

Figura 1 (cont.). Clasificación de las selenoproteínas y sus funciones biológicas.

Además de las selenoproteínas citadas, existe otra **selenoproteína en la cápsula mitocondrial de los espermatozoides**. En la actualidad se encuentra en discusión si se debe considerar una variedad de la proteína fosfolípido hidroxidroxidasa o una selenoproteína independiente.^{31,32} Esta proteína contiene tres residuos de SeCys y ha sido identificada únicamente en tejidos de espermatozoides de ratas, aunque estudios realizados en humanos indican que su función está relacionada con la fertilidad y la reproducción, ya que se inhibe su síntesis cuando existe deficiencia de Se en el organismo, originando esterilidad por la disminución de la movilidad de los espermatozoides.³³

I.2. Implicaciones Biológicas de las Especies Químicas de Selenio

I.2.1. Efecto Protector

Al Se se le atribuye **capacidad antiviral**, debido a su presencia en la enzima antioxidante, GPx1. La reducción en la actividad de esta enzima produce un aumento en el estrés oxidativo, causando disfunción en el sistema inmunológico. Algunos experimentos realizados en animales con deficiencia en Se, mostraron un incremento en la virulencia del tejido miocárdico, atribuida a la disminución de la actividad de dicha enzima.³⁴ En otro estudio en ratas, se observó que aquellas alimentadas con una dieta pobre en Se, presentaron problemas pulmonares tras padecer gripe.³⁵ La deficiencia de Se también se ha relacionado con enfermedades infecciosas, como el VIH. Estudios in vitro han mostrado que el Se es un nutriente muy importante y un inhibidor de la replicación del virus. En pacientes de VIH se ha correlacionado el estatus de Se con la respuesta inmunológica y la aparición de herpes e infecciones por Candida, que son dos enfermedades asociadas a la progresión del virus VIH 1.³⁶ Baum y col. mostraron que el riesgo de mortalidad en pacientes de esta enfermedad se incrementó con la deficiencia de Se, siendo 20 veces superior que para niveles adecuados de este elemento.³⁷ El Se parece además tener un papel en la reproducción. El bajo contenido de Se en el plasma sanguíneo se ha relacionado con el aborto en mujeres embarazadas de hasta tres meses.³⁸ El Se es también requerido para la biosíntesis de la testosterona y la formación y desarrollo de los espermatozoides.³⁹ Un estudio realizado con hombres infértiles, mostró una correlación positiva entre la concentración de Se en el plasma seminal y la cantidad de espermatozoides.⁴⁰ La suplementación diaria con 100 µg de Se durante 90 días, produjo un aumento de la motilidad de los espermatozoides. Este efecto se relacionó con las funciones

biológicas de la GPx4.⁴¹ Recientemente, se ha demostrado que la administración previa de Se conlleva a resultados satisfactorios en técnicas de reproducción asistida. Se ha demostrado que el tratamiento con varios agentes antioxidantes, entre los que se encuentra el Se, no sólo mejora la calidad del esperma, sino que también ayuda a mantener la integridad del ADN.⁴² Entre los beneficios del Se para la salud humana también se encuentra su protección frente a enfermedades cardiovasculares. Este efecto se ha atribuido a la capacidad de la GPx de evitar la oxidación de lípidos y reducir la agregación plaquetaria.^{43,44}

Varios estudios han mostrado una relación entre la concentración de Se y este tipo de enfermedades, sin embargo no todos los resultados coinciden. Esta disparidad puede atribuirse a la deficiencia de otros agentes antioxidantes. En estados de deficiencia de Se, el aporte de este elemento al cerebro es prioritario, demostrando así su importancia en las funciones de este órgano. Bajas concentraciones de Se en el plasma sanguíneo en ancianos han sido asociadas con senilidad y declinación cognitiva. Los niveles de Se en el cerebro de pacientes de Alzheimer fue 40% inferior a la concentración encontrada en individuos sanos.^{31,45}

1.2.2 Efecto Anticancerígeno

Entre los efectos beneficiosos atribuidos al Se, su papel en la prevención del cáncer quizás sea considerado el más relevante. Debido a esto se ha creído conveniente hacerle mención aparte. Actualmente, existe mucha información sobre las propiedades anticancerígenas del Se. El primer estudio sobre la prevención de cáncer debido a una suplementación nutricional con Se fue desarrollado por Clark y col. en el año 1996.⁴⁶ En los últimos años han aparecido varios estudios realizados con animales de experimentación en los que se muestra la relación entre el Se y la prevención del cáncer.⁴⁷ En este sentido, se ha sugerido que la deficiencia de este elemento conduce a propensión carcinogénica en una gran variedad de tejidos. Dicha susceptibilidad puede ser prevenida con la suplementación de dietas con un contenido de Se supranutricional. El efecto quimiopreventivo de este elemento (suministrado en dosis elevadas) se ha mostrado efectivo en la disminución de la incidencia de cáncer de hígado, pulmón, colon, estómago y páncreas.^{48,49}

Para verificar la hipótesis de que el Se disminuye el riesgo de cáncer, se han llevado a cabo varios estudios en humanos. Entre estos trabajos se encuentra el desarrollado con individuos de una población China, donde el 15% de sus habitantes son propensos a padecer carcinoma

hepatocelular. Las personas que fueron suplementadas con Se (levaduras selenizadas) no desarrollaron cáncer en los cuatro años posteriores, a diferencia de varios individuos pertenecientes al grupo control, a los que se le suministró tabletas placebo.²⁸ Además, se conoce que las personas que tienen concentraciones de Se en sangre inferiores a 0.2 mg/mL poseen un mayor riesgo de padecer cáncer de mama, próstata y colon.¹⁴ En una población de 457 hombres alimentados con una dieta enriquecida en Se se observó una significativa disminución en la incidencia de cáncer de próstata, pulmón, y colon, en comparación con individuos a los que se les suministró placebo.⁵⁰⁻⁵² A la hora de llevar a cabo estudios de este tipo es primordial evaluar los niveles de Se base de las poblaciones, ya que en algunos casos la suplementación con Se puede conllevar a efectos contrarios.⁵³

Aunque la actividad anticarcinogénica del Se ha sido relacionada con ciertos metabolitos, los mecanismos implicados no han sido completamente establecidos. La absorción y distribución en los tejidos, así como la capacidad en la prevención del cáncer, depende de la dosis y de la forma química en que es suministrado.³⁰ Se ha demostrado que la especie metilselenol y otras especies monometiladas son efectivas en la prevención del cáncer.^{47,54} En muchos estudios se ha atribuido a la especie SeMeSeCys, fácilmente metabolizada a metilselenol, su efecto protector frente a distintos tipos de cáncer. Utilizando este compuesto en experimentos realizados con ratas, se constató una mayor efectividad en la prevención del cáncer de mama al comparar los resultados obtenidos con el suministro de otros compuestos de Se más estudiados, como la SeMet.⁵⁵ Otros compuestos sintéticos de Se, no utilizados en la síntesis de selenoproteínas, también han mostrado efectos anticancerígenos. Entre ellos, se encuentran compuestos aromáticos como el trifenilselenonio,⁵⁶ y varios alquil y aril selenocianuros.⁵⁷ En un estudio reciente, desarrollado por Zhang y col., se ha observado que la expresión de proteínas oncogénicas y supresoras del cáncer de próstata está directamente afectada por la especie de Se. Mientras que el Se(IV) y la SeMet modificaron la expresión de proteínas relacionadas con el desarrollo cancerígeno en ratones portadores, la especie SeMeSeCys se asoció con la reducción de los riesgos asociados a este tipo de cáncer.⁵⁸ El efecto anticancerígeno del Se también puede estar relacionado con su capacidad de mejorar la respuesta del sistema inmunológico. Las selenoproteínas que tienen una función antioxidante (GPx, TR, ID, etc.) podrían estar implicadas en la prevención del cáncer. Sin embargo, aún no está completamente establecido si la protección del Se contra el cáncer está exclusivamente relacionada con la actividad de las selenoproteínas.⁴⁷ Existe una discusión sobre si son las selenoproteínas, los seleno compuestos de bajo peso molecular,^{59,60} o ambos⁶¹ los responsables de la actividad anticarcinogénica. En un estudio reciente se ha demostrado que

algunas selenoproteínas parecen tener una “doble cara” respecto a la prevención y la promoción de cáncer. TRxR1 y Sep15 ejercen una función anticancerígena en células normales, mientras que en células malignas se ha visto el efecto contrario. En estudios in vivo también se ha demostrado que la deficiencia de algunas selenoproteínas es capaz de inhibir el desarrollo de ciertos tipos de cáncer.^{62,63} En conclusión, no todas las selenoproteínas responden de la misma manera a la suplementación o deficiencia de Se.^{64,65}

Toda la información recogida en la bibliografía refleja la complejidad que existe a la hora de definir al Se como un agente protector contra el cáncer.

I.2.3. Toxicidad

Efectos de la Deficiencia de Selenio

La deficiencia de Se disminuye la expresión de las selenoproteínas y por lo tanto los procesos biológicos en los cuales están involucradas dando lugar a la aparición de enfermedades. En estados carenciales moderados, las selenoproteínas con funciones biológicas de mayor importancia permanecen estables, excepto cuando la deficiencia es crónica. Mientras tanto, las selenoproteínas de importancia biológica menos relevante, disminuyen notablemente su actividad. La ingestión de complementos nutricionales enriquecidos en Se puede revertir esta situación, provocando que las proteínas se recuperen rápidamente.⁶⁶

En estados carenciales, el aporte de Se al cerebro, sistema endocrino y reproductor, se mantiene en general en niveles adecuados, lo que demuestra la importancia de este elemento en las funciones biológicas desempeñadas por estos órganos.⁶⁷ Por otra parte, el hígado, los músculos esqueléticos y el corazón son menos prioritarios para el Se, y por tanto, los primeros en presentar lesiones ante niveles carenciales de este elemento.

En regiones donde el contenido de Se es bajo en aguas y suelos pueden aparecer enfermedades endémicas relacionadas con estados deficientes de este elemento. En 1935 se identificó por primera vez la enfermedad de Keshan (una cardiopatía endémica) en los habitantes de la región rural China a la que debe su nombre, producida por el escaso contenido de Se en la dieta.⁶⁸ La suplementación de Se resultó ser efectiva en la protección frente a esta enfermedad,⁶⁹ confirmando así la relación de este elemento con la aparición de la enfermedad. En zonas de China, Liberia y Tíbet, también se ha identificado la enfermedad de

Kashin-Beck, una osteoartropatía deformativa que provoca atrofia, degeneración y necrosis de los cartílagos, y afecta fundamentalmente a las extremidades. La concentración de Se en orina y plasma sanguíneo de pacientes que sufrían esta enfermedad fue de 12 µg/L y 11 µg/L respectivamente, frente a 18 µg/L y 60-100 µg/L, encontrados en los mismos fluidos biológicos de individuos de zonas colindantes donde no existe deficiencia de este elemento. El cretinismo mixedematoso se ha desarrollado en zonas donde la deficiencia de yodo y selenio es simultánea. Afecta el desarrollo neurológico, crecimiento esquelético, hipotiroidismo y atrofia de la tiroides.⁷⁰

Para prevenir estos estados carenciales se han llevado a cabo diversas iniciativas como el incrementar el nivel de Se en la dieta.^{53,71} El estudio de la dosis aplicada es importante desde el punto de vista de la salud humana, ya que el intervalo de concentración de Se para que sea considerado deficiente, esencial o tóxico es muy estrecho. En el siguiente apartado se citan varios casos de toxicidad a lo largo de la historia y las enfermedades más importantes originadas por una elevada ingesta de Se.

Efectos de los Elevados Niveles de Selenio: Selenosis

Las primeras evidencias de la toxicidad inducida por Se (selenosis) se observaron en animales que pastaban en zonas seleníferas, donde el contenido de Se en el forraje era elevado. En 1930 se identificaron las enfermedades conocidas como “enfermedad alcalina” y “vértigo ciego” en caballos y ganado que pastaban en el Sur de Dakota.⁶⁸ Los síntomas de esta enfermedad fueron: ceguera, pérdida de peso, desorientación y afecciones respiratorias, y se producen por la ingestión de plantas con un elevado contenido de Se.⁷² También se han observado casos de toxicidad por Se en pescados y aves acuáticas, principalmente en lagos de Carolina del Norte, Colorado y Texas, en la década de 1980. Los síntomas de toxicidad incluían una notable disminución de la reproducción, trastornos patológicos e incluso la extinción de algunas especies.^{73,74} Los casos de toxicidad por Se en humanos son escasos⁷⁵ y los problemas asociados a la toxicidad del Se son en general, mucho menores que los relacionados con su deficiencia. La exposición ocupacional es la principal vía de intoxicación con Se. La mayor población de riesgo la constituyen los trabajadores de las industrias de Se y fundiciones de cobre, donde se han detectado casos de envenenamiento por inhalación de especies volátiles como SeO₂, SeOCl₂ y SeH₂.⁷⁶ La intoxicación crónica en humanos se produce por la elevada ingestión de Se. El consumo de productos locales en ciertas zonas de China (Hubei), con un contenido extremadamente alto en suelos (8 mg/kg) y aguas (0.05 mg/L), provocó un episodio

de intoxicación en sus habitantes.⁷⁷ Además de pérdidas de uñas y pelo, otros de los síntomas fueron polineuritis y afecciones gástricas. La anorexia, dolor abdominal, diarrea, fatiga, irritabilidad, depresión, caries dental y edema pulmonar, son otros de los síntomas de selenosis.⁷⁸

I.3. Distribución del Selenio en el Medio Ambiente

La presencia de Se en el medio ambiente se debe a procesos naturales y antropogénicos. La movilidad, acumulación y transformaciones de Se en el ecosistema dependen de diversos factores, como la temperatura, el pH, las condiciones redox y la actividad microbiana.

El **Se en la atmósfera** se encuentra fundamentalmente en forma de partículas en suspensión que forman un fino aerosol, aunque también puede presentarse en estado gaseoso. Los niveles de Se en el aire oscilan entre 0.01 y 3 ng/m³, localizándose los valores más elevados cerca de zonas industriales.⁷⁹

Entre las fuentes de Se antropogénicas se encuentran: la minería y la incineración de caucho, residuos y papel. El SeO₂ y el Se elemental son las especies mayoritarias emitidas en estos procesos.⁸⁰ La erosión de rocas y suelos; y principalmente las emisiones volcánicas, son las fuentes más importantes de emisión natural de Se a la atmósfera. La actividad microbiana, de algas y plantas superiores contribuye a la liberación de este elemento en formas biometiladas.⁸¹ Los compuestos volátiles de Se encontrados son: DMSe, DMDS_e, SeO₂ y H₂Se, el cual es inestable en la atmósfera y se oxida rápidamente.

El **Se en los suelos** procede generalmente del agua de escorrentía procedente de cultivos agrícolas en suelos seleníferos y de las aguas residuales de refinerías de petróleo o plantas generadoras de electricidad. En general, el que procede de los procesos agrícolas se encuentra como Se(VI), y el que se encuentra en las aguas residuales de la industria del petróleo como Se(IV).⁸² En suelos y sedimentos la concentración de Se es muy variable. Así, en ciertas regiones de Irlanda la concentración de Se alcanza los 1250 mg/kg, aunque en la mayoría de los suelos el contenido oscila entre 0.01 y 2 mg/kg.⁶⁸ La distribución de especies en el suelo depende entre otros factores, de la acidez, el contenido de materia orgánica y la aireación. En suelos ácidos la especie predominante es el Se(IV), mientras que el Se(VI) es mayoritario en suelos básicos.⁸³

El **Se en los sistemas acuáticos** proviene principalmente de las actividades agrícolas, las aguas albañales, las cenizas de la combustión de carbón de plantas generadoras de energía, refinerías de petróleo y de la minería de fosfatos y otros metales.⁸⁴ Aunque pueden ser encontradas especies metiladas debido a la actividad microbológica, las especies predominantes en aguas son el Se(VI) y el Se(IV). En aguas superficiales y subterráneas, el contenido de Se es variable (0.06-400 µg/L) y depende de factores geológicos, encontrándose los valores más elevados cerca de suelos seleníferos. Las concentraciones en agua de mar son más bajas (0.004 µg/L y 0.06 µg/L, en la superficie y en las profundidades, respectivamente).⁸⁵ La concentración máxima de Se permitida en aguas de consumo por la EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos) es 50 µg/L.⁸⁶

I.3.1. Bioacumulación y Biotransformación de Selenio en Plantas

Las plantas pueden incorporar Se a partir del suelo, el agua y la atmósfera, así como transformarlo y metabolizarlo.⁸⁷ Según su comportamiento respecto a la acumulación de Se, como a otros metales, las plantas pueden ser **clasificadas** como:

- **Acumuladoras:** aquellas que activamente concentran metales en sus tejidos.
- **Indicadoras:** plantas que reflejan la concentración del metal en el suelo o aquellas cuya presencia se asocia a un determinado metal.
- **No acumuladoras:** plantas que presentan una acumulación restringida o una limitada translocación del metal en un amplio intervalo de concentraciones del suelo.
-

Las plantas absorben Se del suelo principalmente en forma de Se(VI), empleando las mismas vías de incorporación del sulfato, a través de la proteína de transporte sulfato permeasa, localizada en la membrana celular de la raíz. La acumulación de Se(VI) se realiza de forma activa, en contra del gradiente del potencial electroquímico de la membrana celular. Por el contrario, la asimilación de Se(IV) es de forma pasiva y en la mayoría de los casos ocurre en menor extensión.⁸⁸ La capacidad de tolerar, acumular y transformar el Se, como sucede para el resto de los elementos, depende entre otros factores de la especie vegetal. Las especies de las familias *Asteraceae*, *Brassicaceae* y *Legumisoseae*, entre otras, se caracterizan por la hiperacumulación de Se en sus tejidos, alcanzando concentraciones de hasta 10000 mg/kg.⁸⁹ Además, factores como el tipo de suelo, el pH y las condiciones climáticas influyen en la capacidad de acumulación.⁹⁰ En las plantas se han identificado diversos compuestos orgánicos de Se, entre los que destacan SeMet, SeCys₂, γ-Glutamilselenometilselenocisteína (GMetSeCys)

y SeMeSeCys.⁹¹⁻⁹⁵ Así mismo existen plantas capaces de sintetizar compuestos de Se volátiles, dimetilseleniuro (DMS), dimetildiseleniuro (DMDSe) y dietilseleniuro (DESe), como una vía de detoxificación.⁹⁶

El mecanismo de biotransformación de Se en plantas es similar al propuesto en el ciclo del sulfuro.⁸⁷ Cuando el Se inorgánico es suministrado a las plantas, la mayoría es absorbido por las raíces y directamente transportado a las partes aéreas, donde es convertido a formas orgánicas mediante la acción de las enzimas presentes en los cloroplastos. La transformación de Se a SeCys es el primer paso en la formación de compuestos orgánicos de Se. La SeCys es rápidamente convertida a otros compuestos de Se, como el análogo de Se de la glutatona, selenometionina, Se-cistationina, Se-homocisteína..., estos son sólo algunos de los compuestos que aparecen en la Figura 2.

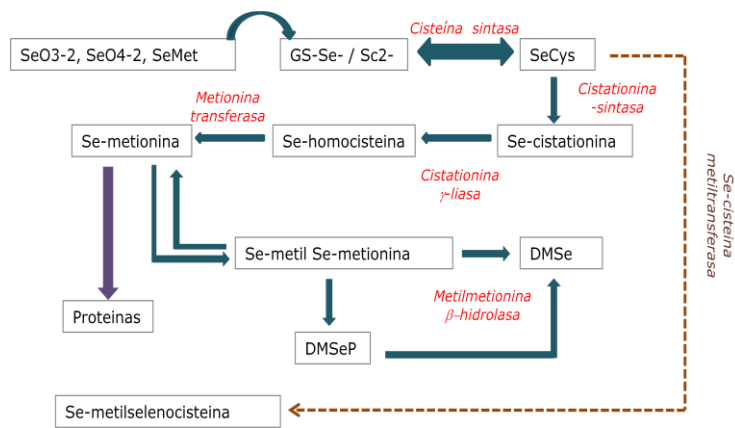


Figura 2. Diagrama esquemático del ciclo de Se en plantas la línea discontinua sugiere una vía alternativa. Adaptado de 87

En plantas que presentan una elevada tolerancia y capacidad para acumular Se, se han identificado especies no proteicas como la SeMeSeCys, resultado de la metilación de la SeCys por la selenocisteína metiltransferasa,^{97,98} evitando así su incorporación en proteínas. Esta especie puede metilarse y originar la especie volátil dimetildiselenio.⁹⁹

La biotransformación puede originar una disminución de la toxicidad de los metales por su implicación en procesos químicos de reducción y/o su incorporación a compuestos orgánicos. Estos procesos son muy importantes en plantas tolerantes a elevadas concentraciones de Se ya que lo transforman en compuestos volátiles que se eliminan a través de las hojas.⁹¹ El conocimiento de los mecanismos implicados no sólo tiene importancia desde el punto de vista del empleo de plantas en fitorremediación, sino desde el punto de vista nutricional.

Efecto Protector del Selenio en Plantas

A pesar de que el Se no es reconocido como un elemento esencial para las plantas, varios estudios demuestran su capacidad antioxidante. Ésta propiedad se encuentra asociada principalmente a la inhibición de la peroxidación de lípidos y al aumento de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa,^{100,101} aunque los mecanismos aún no han sido elucidados. El efecto beneficioso del Se en plantas, depende entre otros factores, de la forma química y la concentración en que se adiciona bien sea al suelo o al cultivo hidropónico, siendo más efectivo cuando se adiciona en forma de Se(IV) y a bajas concentraciones.¹⁰² El Se ha mostrado efectos beneficiosos en la recuperación del estrés foto-oxidativo.^{103,104} La adición de Se a cultivos vegetales ha sido relacionada con un incremento en los niveles de vitaminas antioxidantes como ácido ascórbico, β -caroteno y α -tocoferol,^{103,105} el cual es un reconocido antioxidante que participa en la prevención de la peroxidación de lípidos en los cloroplastos.^{106,107} Del mismo modo, el Se contenido en proteínas purificadas de los extractos proteicos de muestras de arroz también mostró efectos antioxidantes.¹⁰⁸ Además, la adición de Se a diferentes cultivos ha sido correlacionada con un mayor rendimiento del crecimiento de las plantas. En cultivos de patatas, se observó un aumento de la acumulación de almidón y azúcares en las plantas, aumentando así la masa de los tubérculos.¹⁰⁹⁻¹¹¹ La adición de Se(IV) en una concentración de 50 mg/L a cultivos de soja, mejoró los rendimientos en la cosecha mediante la prevención de la degradación de la clorofila.¹¹² El aumento de la concentración de clorofila en estas plantas tratadas con Se en la zona foliar, ha sido atribuido a la eficiencia de las enzimas superoxidismutasa y glutatión peroxidasa en la eliminación de las especies reactivas de oxígeno. El incremento en la actividad de dichas enzimas antioxidantes ha sido correlacionado positivamente con la concentración de Se.¹⁰¹

Las ventajas del enriquecimiento de vegetales con Se no se limitan a los beneficios de este elemento en el metabolismo de la plantas, sino que también **eleva el valor nutricional y la calidad** de las mismas. La adición foliar de Se al té verde, mediante pulverización directa, mejoró la calidad durante el proceso de conservación. Además produjo un aumento en la concentración de este elemento y de la vitamina C, incrementando así su valor nutricional. Aunque el mecanismo mediante el cual el Se produce un aumento en la estabilidad de la vitamina C es desconocido, se propone que puede ser debido a su participación en la biosíntesis de esta vitamina y al incremento de la actividad antioxidante. Las características sensoriales del té enriquecido con Se se favorecieron, lo que se tradujo en mejoras en el sabor, el aroma y el color verde de la infusión (por el aumento del contenido de clorofila).¹¹³ Del

mismo modo, el tratamiento con Se consiguió aumentar el valor nutricional de garbanzos ya que además de la síntesis de SeMet, se produjo un aumento de isoflavonas.¹¹⁴

Numerosos estudios han demostrado la capacidad del Se de reducir los efectos tóxicos de elementos como mercurio¹⁻³ y cadmio⁴ en animales. Sin embargo, poco se conoce sobre este **efecto antagonista** en plantas. Los escasos estudios realizados en muestras vegetales, revelan el efecto protector del Se frente a la toxicidad de ciertos metales.¹¹⁵ Thangavel y col. estudiaron el efecto antagonista del Se frente al mercurio en la planta medicinal *Portulaca olearacea*. La adición de bajas concentraciones de Se al cultivo de esta planta expuesta a cadmio, condujo a una restauración potencial de las hojas afectadas.¹¹⁶ Paralelamente, se ha comprobado el efecto antagonista del Se en hongos *Pleurotus ostreatus* frente al estrés oxidativo inducido por plata y cadmio, mostrando una mayor efectividad en la disminución de la toxicidad, cuando se suministra como Se(IV).¹¹⁷

I.3.2. Bioacumulación y Biotransformación de Selenio en Pescados

El Se es un elemento esencial en pescados^{118,119} dado que, como se ha comentado anteriormente, es uno de los componentes de enzimas antioxidantes como la GPx. Sin embargo, las especies inorgánicas pueden llegar a producir efectos tóxicos en los organismos acuáticos, ya que posee una mayor movilidad y biodisponibilidad en comparación con el Se(IV).¹²⁰ Este elemento puede ser incorporado en los peces a través del agua, mediante ingestión de la misma o a través de la epidermis. Se estima que a partir de una concentración en el agua de 3 a 5 µg Se/L comienza a producirse la acumulación. Sin embargo, la principal vía de incorporación de Se es la cadena trófica, mediante la alimentación de otras especies marinas (zooplancton, fitoplancton y peces más pequeños) que a su vez acumulan el Se proveniente del agua y los sedimentos.¹²¹ Cabañero y col. determinaron el contenido de Se en diferentes pescados (atún, pez espada y sardina), encontrándose entre 1.13±0.04 µg Se/g y 1.58±0.02 µg Se/g.¹²² En niboshi, un procesado derivado de la anchoa Japonesa (*Engraulis japonicus*) también se han cuantificado concentraciones similares.¹²³ Sin embargo, es interesante comentar que recientemente se han encontrado concentraciones de Se mucho más elevadas (6.280 µg Se/g) en especies como *Misgurnus anguillicaudatus*.¹²⁴ El máximo contenido de Se en peces establecido por la EPA como no tóxico (efectos teratogénicos, efecto sobre la reproducción, etc) para el animal es de 7.9 mg Se/kg (peso fresco).¹²⁵ Sin embargo, algunos autores, dependiendo de la especie marina en particular y de otros factores, recomiendan límites diferentes.^{126,127} A inicios de la década de los 80 se realizaron estudios en

peces que habitaban en sistemas acuáticos con un elevado contenido de Se proveniente fundamentalmente de la minería. Estos estudios demostraron el efecto tóxico de este elemento cuando se encuentra presente en concentraciones elevadas, siendo el hígado y el riñón los órganos que presentaron una mayor acumulación. La masiva desaparición de peces en sistemas acuáticos como el lago Belews (Carolina del Norte, EEUU) y el lago Martin (Texas, EEUU), así como la disminución de la reproducción de las especies del lago Sweitzer (Colorado, EEUU) por la presencia de altos contenidos de Se, son algunos de los ejemplos más estudiados.^{73,74}

Aunque se desconocen los mecanismos mediante los cuales el Se causa toxicidad en los peces, se asume que es debido a la incorporación inespecífica del Se en las proteínas.⁷⁴

Por otra parte sus efectos beneficiosos han sido demostrados en varias especies acuáticas. Estudios recientes realizados en carpas de la especie *Carassius auratus gibelio*, alimentadas con Se inorgánico (Se(IV)) y orgánico (SeMet), mostraron el efecto beneficioso del Se en el crecimiento de los peces, y un incremento de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa y de la cantidad de Se acumulada en el músculo.^{128,129} A diferencia de la amplia bibliografía existente sobre la acumulación de Se y sus especies en plantas, la información en pescados es bastante limitada. Los estudios enfocados a la biotransformación de Se en tejidos y músculos de pescados muestran que la SeMet es una de las principales especies identificadas.^{124,130,131} Otras especies orgánicas como SeCys₂ y TMSe⁺ también han sido identificadas en pescados y mariscos.¹³² Además de SeMet, Gong y col. detectaron SeCys₂ en el músculo de *Misgurnus anguillicaudatus*.¹²⁴ Moreno y col. también encontraron que SeMet era la especie principal en truchas, aunque también se detectó TMSe⁺ y varias especies de Se que no pudieron identificarse.¹³² Recientemente, Yamashita y col. han descubierto un nuevo compuesto de Se presente en diferentes tejidos y sangre de atún. Este compuesto, derivado de la ergotioneina (compuesto cíclico con un grupo tiol), se ha denominado selenoneina y se caracteriza por su elevada actividad antioxidante.¹³³

Aunque los niveles de Se en algunos pescados son elevados, en muchos casos la biodisponibilidad de este elemento depende por un lado de la forma química en la que se encuentra, y por otro lado está limitada debido a la interacción con otros metales.¹³⁴ Un aumento de los niveles de actividad de la enzima GPx indicó que la biodisponibilidad de la SeMet fue mayor que la del Se(IV) en muestras de salmón enriquecidas.¹³⁵ El mercurio es uno de los metales más abundantes en pescados, y su presencia es capaz de reducir la

biodisponibilidad del Se.¹³⁶ La biodisponibilidad de la SeMet y el MeHg fue diferente en muestras de sardina, atún y pez espada debido al efecto antagonista ejercido por el Se.¹³⁷

I.4. Desarrollo de Alimentos Funcionales

El análisis de los datos disponibles permite estimar que cientos de millones de personas en todo el mundo no consumen el aporte de Se suficiente a través de la dieta. La necesidad de alcanzar los valores necesarios de Se en la dieta ha impulsado el desarrollo de alimentos funcionales enriquecidos con este elemento. Sin embargo, se debe ser muy cauteloso con la forma de suplementación utilizada, así como con la dosis que se ingiere y el tiempo de administración. El intervalo de concentraciones de Se para que sea considerado deficiente, esencial o tóxico, es muy estrecho. Se estima que la ingestión de alimentos con concentraciones inferiores a 0.1 mg Se/kg puede dar lugar a estados carenciales y por encima de 1 mg Se/kg causar toxicidad.²⁶ La principal forma de incorporación de Se en los seres humanos es a través de la dieta,¹³⁸ y se ha estimado que la cantidad diaria recomendada de Se (Recommended Dietary Allowance, RDA) depende de la región, del país, de la edad y el sexo. En la actualidad el valor recomendado es 55 µg para adultos de ambos sexos.¹³⁹

La cantidad de Se ingerida a través de la alimentación está estrechamente relacionada con la concentración en el suelo de la región. Dumont y col. compilaron información del contenido de Se en suelo y los valores de ingesta diaria, así como la concentración en orina, suero y leche materna en varios países. Los resultados de esta comparación confirman que los niveles de Se en el organismo son altamente dependientes de su contenido en el suelo.²⁷ Por lo tanto, la suplementación con Se de una población, necesaria cuando existe un déficit de este nutriente en la dieta, es posible directamente, a través del enriquecimiento de algunos alimentos (alimentos funcionales), o indirectamente, por medio de la fertilización previa de los suelos.¹⁴⁰

Un **alimento funcional** puede ser definido como aquel, que además de satisfacer las necesidades básicas de nutrientes y manteniendo sus características organolépticas, proporciona beneficios para la salud o disminuye el riesgo de contraer determinadas enfermedades. El diseño de alimentos funcionales implica la incorporación de ingredientes, eliminación de constituyentes no deseados o el incremento de la concentración de un determinado componente (micronutrientes). El objetivo de estos alimentos es prevenir y no curar, ya que no son fármacos. El desarrollo de los mismos es una de las áreas de mayor crecimiento científico dentro del campo de la tecnología alimentaria y biotecnología como

refleja el hecho que, desde el año 1970 hasta el 2013 se han publicado más de 5600 artículos relacionados con esta temática, el 80% de ellos publicados en los últimos 10 años.

Actualmente existe un gran interés por desarrollar alimentos funcionales en Se.¹⁴¹ En el mercado farmacéutico se encuentran dos tipos diferentes de suplementos que contienen Se: **complejos vitamínicos** que contienen un cierto número de vitaminas y minerales, en los cuales el Se es incluido generalmente en forma de seleniato de sodio, y los preparados a partir de levaduras (**levaduras selenizadas**). Estos últimos en su mayoría son elaborados a base de levadura *Saccharomyce cerevisiae*, la cual, dependiendo de las condiciones de cultivo puede acumular elevadas cantidades de Se (3000 mg/kg) y biotransformarlo a SeMet.¹⁴²⁻¹⁴⁵

El uso de la levadura selenizada no se restringe a la preparación de suplementos farmacéuticos sino que también ha sido empleada en la elaboración de pan. En la región del Norte de Ucrania, una de las estrategias para incrementar la ingesta de Se en sus habitantes, fue elaborar el pan con levadura enriquecida. El contenido de Se en el pan, fundamentalmente como SeMet, correspondió a un 25% de la cantidad diaria.¹⁴⁶

Una dieta deficiente en Se en los humanos es normalmente debida a una ingestión de vegetales destinados al consumo humano con una concentración imperceptible de Se, debido a su baja biodisponibilidad en la mayoría de los suelos agrícolas,^{138,147} especialmente en distintas zonas de mundo como son: China, UK, Este de Europa, Africa y Australia.¹⁴⁸ Dada esta baja biodisponibilidad y debido al papel de los vegetales como principal fuente de este elemento en la dieta, están apareciendo muchos trabajos enfocados a incrementar el contenido de Se en las plantas destinadas al consumo humano y animal a través de los denominados programas de biofortificación.^{149,150}

I.4.1. Procesos de Enriquecimiento con Selenio: Biofortificación

La **biofortificación** ha sido definida como el proceso de incrementar la concentración biodisponible de elementos esenciales en la parte comestible de las plantas cultivadas mediante intervención agronómica o selección genética.¹⁵¹ Posteriormente, Campos-Bowers y Wittenmyerr, definieron la biofortificación como una técnica relativamente nueva que implica la mejora de las principales variedades de plantas cosechadas con el fin de incrementar los niveles de nutrientes específicos en los tejidos vegetales requeridos para el consumo humano o animal (Figura 3).¹⁵² Sin embargo esta técnica es compleja ya que para que sea eficaz hay que

considerar factores como: la selección de variedades, reducción de antinutrientes e incremento de sustancias que promuevan la absorción de nutrientes.

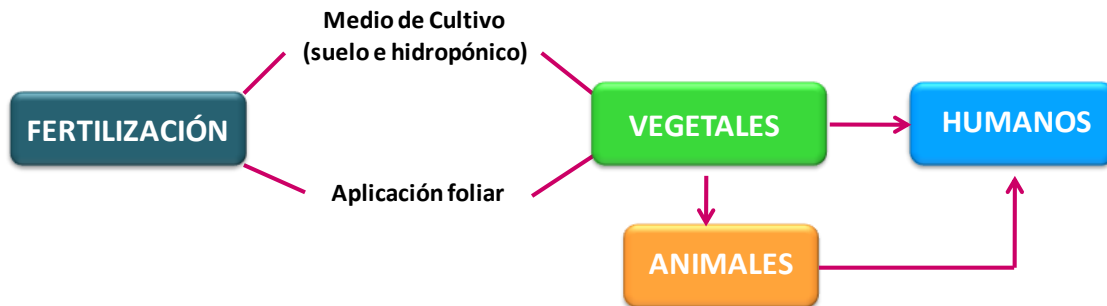


Figura 3. Ciclo de nutrientes en el proceso de biofortificación

El gobierno de Finlandia, en el año de 1984, llevó a cabo un programa nacional para adicionar Se(IV) sódico a las tierras de cultivo con el objetivo de paliar las carencias de Se en alimentos. En este país, la concentración en el suelo no es especialmente baja pero dadas las características del suelo, la biodisponibilidad de este elemento es muy reducida. El uso de fertilizantes agrícolas enriquecidos en Se evitó enfermedades en animales domésticos y produjo un incremento de un 50% en la concentración de Se total en sangre de los finlandeses.⁶⁸ En China, la suplementación con Se(IV) sódico también fue utilizada para controlar las enfermedades de «Keshan» y «Kashin-Beck».¹⁵³

Para llevar a cabo con éxito un programa de biofortificación hay que superar una serie de barreras que pueden disminuir la eficacia del proceso. En primer lugar, la dificultad más importante es conocer con exactitud la concentración del micronutriente necesaria en la rizosfera, ya que un incremento en la biodisponibilidad de dicho elemento en la rizosfera aumentara la absorción del mismo por las plantas. Por otro lado, también hay que considerar que la absorción del elemento puede incrementarse mediante la estimulación de ciertos procesos en las células radiculares que pueden aumentar la solubilidad y movimiento del nutriente, lo cual se puede conseguir mediante la estimulación de eflujos radiculares, como H^+ , aplicación de sustancias quelatantes y una mayor superficie radicular. En segundo lugar, las células radiculares de las plantas deben poseer en la membrana plasmática mecanismos de absorción que deben ser suficientes y específicos para permitir la acumulación del elemento una vez que entre en el apoplasto de las células radiculares desde la rizosfera. Y por último, y

en tercer lugar, los micronutrientes deben ser eficientemente transportados hacia las partes comestibles de las plantas y allí acumulados sin provocar los efectos tóxicos.¹⁵⁴

La biofortificación ha resultado eficiente para elementos traza como el Fe, Zn e I.¹⁵⁵ En el caso del Se, las dos formas más utilizadas son el seleniato y el selenito sódico ya que las plantas las absorben con mayor facilidad en comparación con otras especies orgánicas muchos menos disponibles (SeMet y SeCys). Se ha demostrado que el empleo de selenito es más eficaz en procesos de biofortificación ya que su biotransformación a compuestos orgánicos en las plantas suele ser mayor. En este sentido, han aparecido estudios de biofortificación de Se en cultivos de arroz,¹⁴⁸ en diferentes variedades de trigo,¹⁵⁶ y rábano.¹⁵⁷

La biofortificación de plantas con cualquier nutriente es un estudio complejo que requiere una exhaustiva investigación previa antes de ser llevado a la práctica. Sin embargo, la importancia que actualmente tiene la nutrición humana y las posibilidades que abre la biofortificación en la mejora de la calidad de vida en la población mundial, ha hecho que esta mejora agrícola esté siendo impulsada por distintos organismos mundiales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Grupo Consultivo Internacional sobre Investigación Agrícola (CGIAR).

Otra Forma de Biofortificación de Cultivos: Empleo de Plantas Transgénicas.

Las plantas transgénicas contienen uno o más genes que han sido insertados de forma artificial en lugar de que la planta los adquiera mediante la polinización. La secuencia génica insertada (llamada transgen) puede provenir de otra planta no emparentada o de una especie completamente diferente: por ejemplo, el maíz Bt, que produce su propio insecticida, contiene un gen de una bacteria. Las plantas que tienen transgenes a menudo son llamadas genéticamente modificadas o cultivos GM (*genetically modified*). La Transgénica, es decir la técnica de transferir genes, es una herramienta suplementaria para la mejora de especies vegetales cultivadas. Las plantas genéticamente modificadas presentan beneficios, como la tolerancia a los herbicidas poco tóxicos y fácilmente biodegradables, y tienen un valor nutritivo añadido.¹⁵⁸ La biofortificación con Se inorgánico ha sido aplicada con éxito a cultivos de tomate modificados transgénicamente. Dependiendo de la línea transgénica utilizada y del tratamiento de biofortificación, se identificó hasta un 16% del Se total en forma de SeMeSeCys. Además, se observó que la estabilidad de esta especie no se alteró como consecuencia del procesado requerido para la preparación de zumo de tomate.¹⁵⁹

I.5. Metodologías Analíticas para la Determinación de Selenio y sus Especies en Muestras Biológicas

A pesar de que la determinación del contenido total de un elemento es importante, este dato por si solo no ofrece la suficiente información sobre su función biológica, efectos beneficiosos, toxicidad o comportamiento en el medio ambiente. Por lo tanto es necesario conocer la forma química en la que se encuentra el elemento de interés. Las diferentes formas químicas o compuestos de un elemento se llaman especies, y la distribución de especies de un elemento está definida por la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) como especiación.¹⁶⁰ Cuando una especie entra en el organismo, puede experimentar numerosas transformaciones químicas, las cuales alteran sus propiedades. La determinación de las especies en la ruta metabólica y diferentes tejidos permite comprender mejor los mecanismos de absorción celular, transporte, almacenamiento y excreción. Además, la especiación ofrece información sobre las vías de detoxificación y/o acumulación de los elementos.¹⁶¹

En los próximos apartados se exponen las metodologías y técnicas analíticas comúnmente utilizadas tanto para la determinación de la concentración de Se, como para la identificación y cuantificación de sus especies en muestras biológicas.

I.5.1. Procedimientos de Tratamiento de Muestras

El tratamiento de muestra es frecuentemente la etapa más larga, laboriosa y crítica para la detección y cuantificación de elementos metálicos a nivel de trazas. Estos procesos deben ser reproducibles y eficaces, lo que requiere evitar errores por pérdidas de muestra, y contaminaciones procedentes de los reactivos y materiales empleados. Las matrices en las que se han de determinar estos analitos pueden tener características muy diferentes, por lo que en un primer lugar es necesario establecer los modos de muestreo y conservación más adecuados para posteriormente aplicar la metodología analítica requerida.

Existen distintos factores que pueden ocasionar pérdidas, contaminación o transformación de las especies durante los procesos de toma y almacenamiento de las muestras. Durante el almacenamiento de la muestra se pueden alterar la concentración y la forma original del analito como consecuencia de interacciones químicas entre especies o con el material del recipiente, la acción microbiana, la temperatura, el pH, la luz,...,¹⁶² por lo que en muchos casos lo más probable es que sea necesario añadir agentes conservantes para prevenir la degradación de las especies antes del análisis. La Figura 4 ilustra las diferentes etapas llevadas a cabo en un estudio de especiación

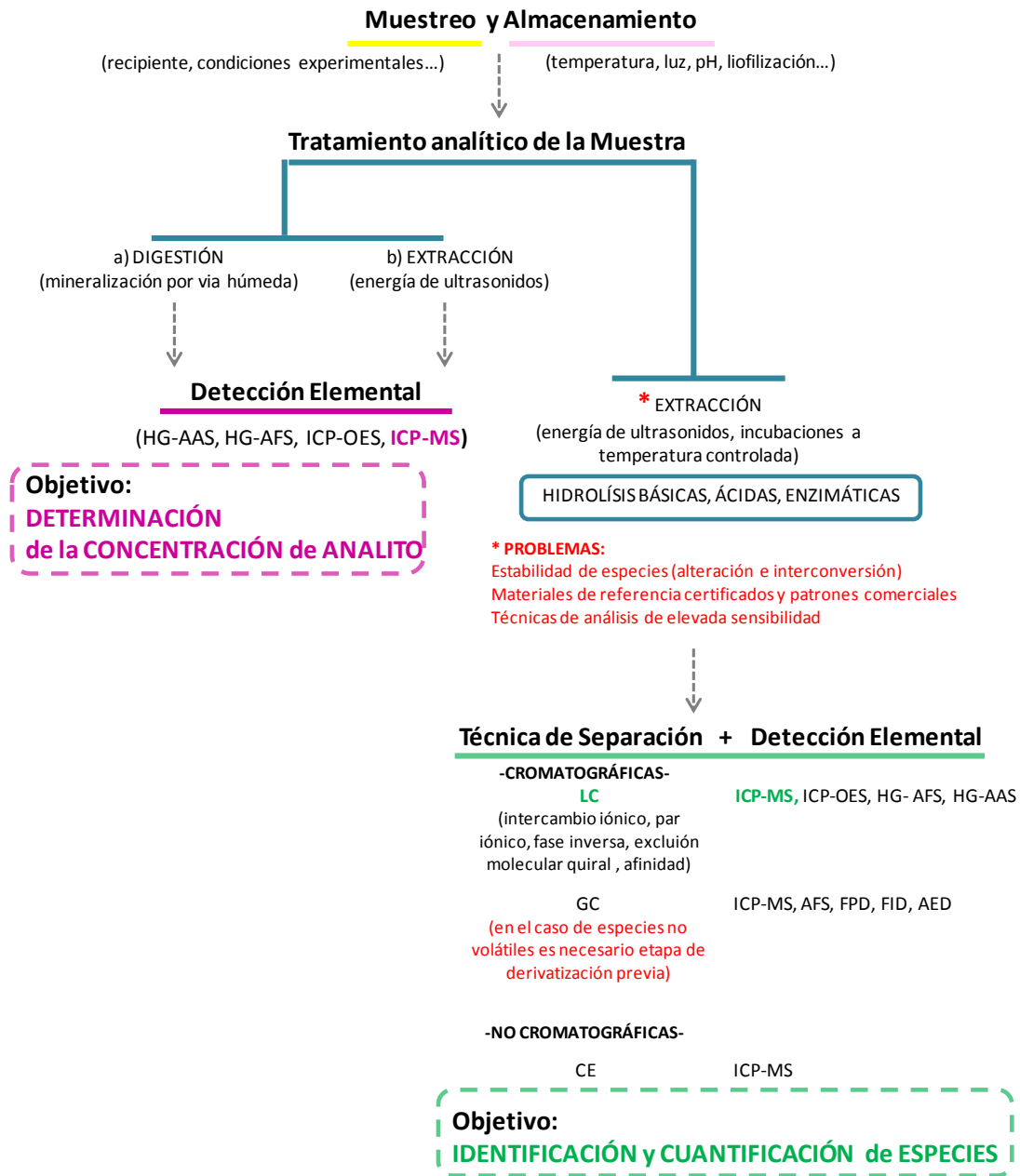


Figura 4. Esquema de trabajo propuesto a la hora de llevar a cabo análisis de especiación de Se en muestras biológicas

Determinación del Contenido de Selenio

Para llevar a cabo la determinación del contenido total de un elemento traza en muestras biológicas se requiere, por lo general, la destrucción de la materia orgánica. Generalmente, el análisis de muestras biológicas y de tipo medioambiental se lleva a cabo mediante procesos de **digestión por vía húmeda**. En este tipo de mineralización es frecuente la adición de uno o más reactivos, generalmente ácidos, con propiedades complementarias (ácido-base, redox y/o

complejantes). La digestión se puede llevar a cabo en placa calefactora o en horno (200-300°C), bien en recipientes cerrados o abiertos. En los recipientes cerrados se alcanzan no sólo altas temperaturas sino también elevadas presiones que contribuyen a la destrucción de la materia orgánica. La digestión en recipientes abiertos sólo es adecuada cuando el analito a determinar no forma especies volátiles. Por ello, para la determinación de compuestos volátiles de Se se recomienda realizar la mineralización por vía húmeda en recipientes cerrados. En los últimos años, se ha extendido el empleo de hornos microondas por las mejoras que suponen en cuanto a la reducción del tiempo de mineralización, la cantidad de reactivos, eficacia y reproducibilidad. La digestión puede llevarse a cabo con HNO_3 ,¹⁶³ $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$,¹⁶⁴ $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ o con mezclas de HNO_3 con otros ácidos.¹⁶⁵

Aparte de la energía asistida por los hornos microondas, la energía de ultrasonidos se ha empleado con bastante frecuencia para las digestiones. Los dispositivos más utilizados son el baño y la sonda de ultrasonidos focalizada (se introduce directamente en el vial que contiene la solución de la muestra). Con esta última se alcanzan altas temperaturas, por lo que a veces es necesaria la aplicación de pulsos para evitar un elevado calentamiento de la muestra. Uno de los problemas que presenta es la emisión de armónicos audibles que resultan muy molestos y el empleo de reactivos químicos que pueden atacar la punta de la sonda. El baño de ultrasonidos consta de un recipiente de acero lleno de agua en el cual la distribución de la energía acústica es indirecta y de forma no homogénea. Con la sonda de ultrasonidos se obtienen potencias incluso 100 veces superiores a las del baño, lo que supone una reducción drástica del tiempo de tratamiento de muestra.¹⁶⁶

Extracción de Especies de Selenio

La tarea de identificar y cuantificar en una muestra las diferentes formas químicas en que se encuentra un determinado analito es extremadamente compleja, y en la actualidad constituye una de las problemáticas más comunes en investigación.

El Se en las muestras biológicas se encuentra frecuentemente como selenoamino ácidos, que pueden estar o no incorporados a proteínas. Cuando el objetivo del análisis es la identificación de estas proteínas, se debe mantener su integridad durante el tratamiento de muestra. Los tratamientos más comunes para la extracción de proteínas suelen consistir en: extracción en agua,¹⁹ mezcla de metanol y ácido clorhídrico¹⁶⁷ o en una disolución reguladora.²¹ La proteólisis constituye uno de los principales problemas en la extracción de proteínas de la célula, por producirse la liberación de proteasas que normalmente están separadas en diferentes

compartimentos, produciendo la acidificación del medio. De esta manera, las proteínas se pueden desnaturalizar y exponer a ataques proteolíticos. Con el objetivo de prevenir este efecto, se recomienda la extracción de proteínas a temperaturas bajas (40 °C), en las que la actividad de las proteasas es menor, mantener el pH entre 6 y 8, y añadir un cóctel inhibitor de proteasas a la disolución reguladora.^{21,22} Ciertas especies de Se como selenocisteína, selenometionina y selenometilselenocisteína son susceptibles a la oxidación. Debido a que el grupo selenol tiene un potencial de oxidación considerablemente menor que su análogo de azufre,²⁵ para prevenir la oxidación de la selenocisteína se realiza la alquilación con iodoacetamida, que es un procedimiento habitual en los tratamientos de muestra de proteínas ricas en cisteína.^{26,168} Otra alternativa para prevenir la oxidación tanto de los residuos de selenocisteína (por la formación de enlaces Se-Se y Se-S), así como de selenometionina, es la adición de agentes reductores como ditioteritol (DTT) y β -mercaptoetanol.^{169,170}

Entre los tratamientos de muestra más utilizados para la extracción de selenoamino ácidos se encuentran las **hidrólisis ácidas** o **básicas**, y principalmente las **hidrólisis enzimáticas**, basada en la ruptura de los enlaces peptídicos utilizando enzimas. Esta última es una de las más desarrolladas debido a que en las dos primeras la degradación de las especies ocurre con facilidad.

El tratamiento enzimático se realiza en condiciones de temperatura y pH moderados, evitando así la alteración o degradación de especies.¹⁷¹ Las proteasas, enzimas no específicas, son las más utilizadas en este tipo de tratamiento de muestra, entre ellas la Proteinasa K, Pepsina, Subtilisina, y la Pronasa E (Proteasa tipo XIV aislada de *Streptomyces griseus*), siendo esta última la más utilizada. Sin embargo, aunque la degradación de las especies no es significativa, los rendimientos de extracción en algunas matrices son bajos, probablemente debido a que la enzima no es capaz de hidrolizar los enlaces del analito en la matriz. Dependiendo del tipo de matriz, en muchas ocasiones es necesaria la utilización de enzimas como lipasas (recomendadas para muestras con alto contenido lipídico), y amilasas (utilizada en la hidrólisis de glucógeno y almidón).¹⁷² La selenometilselenocisteína y γ -glutamilselenometilselenocisteína, especies de Se presentes fundamentalmente en vegetales pertenecientes a las familias *Allium* y *Brassicaceae*,^{168,26} no se encuentran incorporadas a proteínas.²⁷ Dado que estas especies no son proteinogénicas, la extracción de las mismas es independiente de si la hidrólisis es o no enzimática.¹⁶⁸ Para la extracción de especies de Se que pueden estar incorporadas a proteínas, la hidrólisis enzimática, es una de las más prometedoras. En la Tabla 2 se recogen varios ejemplos de tratamientos de diferentes muestras de origen biológico empleando enzimas para la extracción de especies de Se.

Tabla 2. Ejemplos de muestras tratadas empleando la hidrólisis enzimática para la extracción de las especies de Se presentes

Muestra	Tratamiento enzimático	Especies identificadas
Mostaza India, nueces de Brasil	Proteínasa K, agitación en oscuridad 20 h/37 °C. ^{173,30}	SeMet
Champiñones	1. H ₂ O 3h/37 °C agitar 200 rpm. 2. pepsina 0.05M Tris-HCl a pH 2.1 20h/37 °C agitar 200 rpm. 3. tripsina 0.1M reguladora de fosfato a pH 7.6 20h/37 °C agitar 200 rpm. ⁵⁴	SeCys ₂ y Se(IV)
Hígado, riñón y músculo de pollo	Proteasa XIV, 0.1 M Tris-HCl disolución reguladora a pH 7.5, 2 min USP. ⁵⁷	SeMet y especies no identificadas
Ajos, Mostaza India	1. 0.1 M HCl, agitación mecánica 20h/37 °C ó 3 min USP. 2. 0.025 M acetato de amonio pH 5.6, agitación mecánica 20h/37 °C ó 3min USP. 3. Proteasa, agitación mecánica 20h/37 °C ó 3 min USP. ¹⁶⁸	MetSeCys, SeMet y especies no identificadas
Levadura	1. Proteasa XIV+lipasa en Tris-HCl, sonicación 2 h 2. 12h/25 °C. ¹⁷⁴	SeMet y SeMeSeCys
Levadura Ostra Harina	Subtilisina 0.1M Tris-HCl, pH 7.5, 24h/37 °C (2 veces). ⁶⁸	(2 Se(IV) y SeMet SeMet y TMsSe SeCys ₂ y SeMet

Otras enzimas, como la Alcalasa, proteasa bacteriana alcalina producida por *Bacillus licheniformis*, ha sido muy utilizada para la obtención de hidrolizados proteicos de pescados. Su elevada capacidad de hidrólisis en condiciones de pH moderadas es mucho mayor que la de enzimas neutras o ácidas.^{175,176}

Los procedimientos enzimáticos tradicionales implican la incubación a 37 °C durante un tiempo entre 24 y 48 horas. La aplicación de la energía de ultrasonidos focalizada, como se ha comentado en el apartado anterior, ha supuesto una reducción considerable de los tiempos de tratamiento, alcanzándose la extracción total de Se de diversas matrices biológicas en intervalos de tiempo que oscilan entre 15 segundos y 3 minutos. La ventaja de poder reducir considerablemente el tiempo de análisis va acompañada de la desventaja de que la energía de ultrasonidos es más agresiva para las muestras, lo que supone un riesgo para la transformación

de las especies presentes en la matriz. La sonda de ultrasonidos se ha empleado para la extracción de distintas especies de Se (Se(IV), Se(VI), SeMet, SeMeSeCys y SeCys₂) en suplementos alimenticios enriquecidos con Se. Entre las ventajas que supuso el empleo de esta metodología se encuentran: el uso de pequeñas cantidades de muestra (aproximadamente 10 mg) y bajos volúmenes de extracción.¹⁷⁷ La energía de ultrasonidos tiene numerosas aplicaciones en el campo de la química y es empleada para la extracción de los analitos de distintas matrices.^{28,39}

I.5.2. Separación e Identificación de Especies de Selenio.

Técnicas Hifenadas: Métodos Cromatográficos Acoplados a la Espectrometría de Masas

Habitualmente, la determinación de especies requiere el acoplamiento de dos técnicas: una técnica para separar las especies químicas de interés y un método de detección sensible que pueda proporcionar la detección del analito a bajos niveles de concentración. Entre los diversos sistemas de detección (**HG-AAS, HG-AFS, ICP-OES, ICP-MS**), actualmente la **espectrometría de masas mediante plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)** es la más utilizada.

En el desarrollo de esta tesis doctoral se ha empleado la técnica ICP-MS debido a su versatilidad para la determinación de trazas y ultratrazas en materiales biológicos, y a su carácter multielemental. La detección mediante ICP-MS ofrece la posibilidad de realizar medidas de relaciones isotópicas en un intervalo de linealidad superior a cuatro órdenes de magnitud.¹⁷⁸ El analizador de masas más utilizado en ICP-MS es el cuadrupolo, que actúa como filtro separando a los iones en función de su relación masa/carga.

Uno de los problemas de ICP-MS es la presencia de interferencias espectrales. Las interferencias espectrales existentes en la determinación del Se, hace que su monitorización sea a veces problemática.^{179,180} La mayor interferencia es la formación del dímero ⁸⁰Ar²⁺ que solapa con la señal del isótopo más abundante de Se, ⁸⁰Se. Otros isótopos menos abundantes de Se, pero que poseen menos interferencias espectrales son: ⁸²Se, ⁷⁸Se o ⁷⁷Se. El isótopo ⁸²Se es el más empleado en la determinación de Se pues a pesar de tener una abundancia relativamente baja (8,7%) es el menos afectado por interferencias espectrales.⁹² En la Tabla 3 se muestran las principales interferencias para cada isótopo de Se.

Tabla 3. Interferencias para los distintos isótopos de Se en la técnica ICP-MS

Isótopo	Abundancia (%)	Interferencias
⁷⁴ Se	0.89	³⁷ Cl ₂ ⁺ , ⁴⁰ Ar ³⁴ S ⁺ , ⁷⁴ Ge ⁺ , ³⁸ Ar ³⁶ Ar ⁺
⁷⁶ Se	9.36	⁴⁰ Ar ³⁶ Ar ⁺ , ⁴⁰ Ar ³⁶ S ⁺ , ⁷⁶ Ge ⁺ , ³⁹ K ³⁷ Cl ⁺
⁷⁷ Se	7.63	⁴⁰ Ar ³⁶ ArH ⁺ , ⁴⁰ Ar ³⁷ Cl ⁺ , ⁴¹ K ³⁶ Ar ⁺ , ⁴² Ca, ³⁵ Cl ⁺
⁷⁸ Se	23.78	⁴⁰ Ar ³⁸ Ar ⁺ , ⁷⁸ Kr ⁺ , ³⁸ Ar ⁴⁰ Ca ⁺ , ⁶⁴ Zn ¹⁴ N ⁺ , ⁴⁴ Ca ³⁴ S ⁺
⁸⁰ Se	49.61	⁴⁰ Ar ₂ ⁺ , ⁷⁹ BrH ⁺ , ⁸⁰ Kr ⁺ , ⁴⁰ Ar ⁴⁰ Ca ⁺
⁸² Se	8.73	⁸¹ BrH ⁺ , ⁴⁰ Ar ⁴² Ca ⁺ , ⁸² Kr ⁺

Estas interferencias pueden ser eliminadas mediante el empleo de las celdas de colisión y de reacción, mediante la reacción y/o colisión de los iones poliatómicos interferentes y el gas apropiado, (entre los más utilizados se encuentran el H₂, He y Xe). En el caso del Se, la celda de colisiones es especialmente útil ya que permite la monitorización de los isótopos más abundantes de este elemento, ⁸⁰Se y ⁷⁸Se.¹⁸¹

Como se ha comentado anteriormente, en los análisis de especiación es necesaria una técnica que permita la separación de las especies. Esta separación generalmente se realiza empleando técnicas cromatográficas.

Las técnicas de separación más empleadas son la **cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, High Performed Liquid Chromatography)**, la **cromatografía de gases (GC, Gas Chromatography)**, y la **electroforesis capilar (CE, Capilar Electrophoresis)**. La principal ventaja de CE es la capacidad para la separación de distintos tipos de analitos: cationes, aniones y pequeños iones metálicos, complejos de metales con ligandos orgánicos, compuestos organometálicos y biomacromoléculas. Sin embargo, el pequeño diámetro del capilar y los bajos volúmenes de muestra limitan la obtención de bajos límites de detección.¹⁷¹ Así como las interfases de GC y HPLC con el ICP-MS son relativamente sencillas, el acoplamiento de CE al ICP-MS presenta algunas complicaciones.¹⁸² CE se ha utilizado en la especiación de Se como parte de las separaciones bidimensionales.¹⁷¹

El acoplamiento GC-ICP-MS presenta una elevada sensibilidad y es la técnica más adecuada para el análisis de especies volátiles de Se, como el DMSe.¹⁸³ También se ha empleado en la identificación de especies no volátiles de Se previa derivatización, lo que implica un

tratamiento de muestra más tedioso.¹⁸⁴ Debido a que muchos compuestos de Se de interés biológico son no volátiles, HPLC es la técnica más empleada. En este caso no se requiere una etapa previa de derivatización por lo que se evita la posible descomposición térmica que puede ocurrir en GC. El fácil acoplamiento de los sistemas de HPLC a ICP-MS y los bajos límites de detección que se alcanzan, convierten a esta técnica hifenada en la más adecuada en estudios de especiación de Se. Los mecanismos de separación más utilizados en HPLC son:

Cromatografía de fase inversa y de par iónico (RP, *reverse phase*): La adición de agentes formadores de pares iónicos a la fase móvil extiende la aplicación de esta técnica cromatográfica, ya que permite la separación de moléculas neutras, aniónicas y catiónicas.¹⁸⁵ El ácido trifluoroacético (TFA) y el ácido heptafluorobutírico (HFBA) son los más utilizados.¹⁸⁶ La cromatografía de fase inversa, requiere en ocasiones el empleo de un gradiente de polaridad, pudiéndose alcanzar altas concentraciones de disolventes orgánicos, llegando hasta el 100% de metanol o acetonitrilo. El uso de concentraciones de disolventes orgánicos elevadas afecta negativamente a la estabilidad del plasma en ICP-MS y origina una disminución de la sensibilidad. La introducción de oxígeno al gas plasmógeno y el uso de conos de platino, constituyen una alternativa para utilizar fases móviles con un alto contenido de disolventes orgánicos.¹⁸⁷

Cromatografía de intercambio iónico (AE, *anion exchange*): La capacidad de los grupos cargados positivamente de la fase estacionaria para atraer a los aniones del soluto, y de los grupos cargados negativamente de atraer a los cationes, ha dado lugar a que ambas fases estacionarias se hayan utilizado frecuentemente en la separación de especies de Se iónicas. En los intercambiadores aniónicos, los grupos cargados positivamente en la fase estacionaria atraen a los aniones del soluto, mientras que los intercambiadores catiónicos contienen puntos cargados negativamente que atraen a los cationes de soluto.¹⁸⁸

Cromatografía de exclusión molecular (SEC, *size exclusion*): Es el método de separación más utilizado para la separación de péptidos y proteínas. Se recomienda en la separación de biomoléculas de alto peso molecular, en las cuales el heteroátomo se encuentra complejoado por coordinación y no por enlaces covalentes carbono-metal, como sucede en el caso de los compuestos de bajo peso molecular. La resolución de esta técnica es baja comparada con otros mecanismos de separación, aunque es muy utilizada como técnica preparativa en separaciones multidimensionales.^{189,190}

El acoplamiento HPLC-ICP-MS permite la identificación de especies mediante comparación de los tiempos de retención de las especies a identificar y de los patrones disponibles. Sin embargo, la co-elución de especies y la falta de patrones comerciales, son los principales problemas asociados a una correcta identificación y confirmación de la identidad de las especies.

Técnicas Moleculares

Para obtener información estructural se requiere el uso de técnicas moleculares de ionización suave, tales como la **espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS, *electrospray mass*)** y la **espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF, *matrix assisted laser desorption/ionization time of flight*)**. Estas técnicas permiten paliar la falta de patrones comerciales para la identificación de especies, aunque presentan como desventaja su elevado coste económico y baja sensibilidad, lo que implica la aplicación de etapas sucesivas de preconcentración de los extractos.

La técnica de **ESI-MS** permite la detección de la presencia de compuestos que contienen Se de forma relativamente sencilla, basándonos en la identificación del patrón isotópico de este elemento en el espectro de masas, así como la determinación precisa del peso molecular de las especies.¹³³ Sin embargo, para obtener información estructural de las mismas se requiere el uso de un *tándem* de espectrómetros de masas, en el cual se utiliza la disociación inducida por colisión (CID, *collisioni-induced dissociation*) para reproducir la fragmentación del ion molecular de interés. Una de las estrategias desarrolladas para la confirmación de la estructura de las especies de Se es la fragmentación del compuesto análogo de azufre. La identidad de la especie queda confirmada al obtener fragmentos que difieren en 48 unidades, que corresponde con la diferencia de masas de los isótopos ^{80}Se y ^{32}S .⁷⁷ Una de las principales desventajas de ESI-MS con respecto a ICP-MS, es la baja sensibilidad, lo cual representa un problema para la especiación en muestras reales donde la concentración del elemento de interés se encuentra a niveles de trazas o ultratrazas. La mayoría de los análisis de especiación de Se utilizando ESI-MS han sido encaminados a la elucidación estructural de Se-péptidos resultantes de la digestión triptica de proteínas solubles en agua en muestras de levaduras enriquecidas con Se.¹⁹¹ Del mismo modo, esta técnica también ha sido utilizada para la determinación de especies de Se en plantas cultivadas en medios enriquecidos con Se.¹⁹²

A diferencia de ESI, **MALDI** presenta una elevada tolerancia a los contenidos de sales y otras interferencias. Entre sus características destacan la sencillez, robustez y sensibilidad. Estas

características hacen que sea una técnica atractiva para la detección de especies que no pueden ser analizadas por ESI. El acoplamiento con un detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) permite la determinación precisa de la masa de los iones, basado en el tiempo que tardan en alcanzar el detector, dependiendo de la relación masa/carga (m/z). La mayoría de las aplicaciones de MALDI-TOF en la especiación de Se se limitan a la caracterización de la fracción soluble de proteínas de levaduras enriquecidas con Se.^{169,193,194}

I.5.3. Problemática y Validación de los Resultados en Especiación de Selenio

La determinación de las especies de Se en muestras biológicas puede llegar a ser bastante compleja. Durante las etapas de extracción de especies y separación de las mismas, debe asegurarse la integridad tanto de la forma química como de la concentración de la especie buscada. La identificación de especies no debe realizarse basándonos exclusivamente en los tiempos de retención ya que la posible co-elución de especies puede dar lugar a informaciones erróneas. Generalmente, es necesario el uso de varias técnicas cromatográficas con el fin de establecer sin ambigüedad la identidad de las especies. Del mismo modo, la validación de la eficiencia de los procesos de extracción requiere el uso de materiales de referencia certificados, la realización de test de comparación entre laboratorios y el empleo de metodologías analíticas independientes.

A pesar de que son varios los materiales de referencia que se encuentran actualmente disponibles, su número es aún limitado, teniendo en cuenta que para una correcta validación de los resultados, la matriz del material de referencia debe ser la misma, o muy similar a la de la muestra a analizar, y la concentración de las especies del mismo orden.

Con el objetivo de superar los inconvenientes derivados de la falta de materiales de referencia y de los métodos clásicos de calibración, la técnica de **análisis por dilución isotópica** (IDA, *Isotopic Dilution Analysis*) se considera como una estrategia muy útil para la determinación de metales en diferentes matrices. La dilución isotópica está basada en la medida de la relación isotópica de un elemento en una muestra, en la que su composición isotópica se ha alterado mediante la adición controlada de una cantidad conocida de ese elemento enriquecido isotópicamente (conocido como trazador o *spike*).¹⁹⁵ La principal ventaja que presenta el análisis por dilución isotópica es la independencia respecto a posibles variaciones en la sensibilidad del equipo y a los efectos de la matriz. Entre los diferentes métodos de ID, los más empleados son: “**species-unspecific**” (también conocido como ID inespecífica o post-columna) y “**species-specific**” (ID específica). En el primer caso, el trazador

puede encontrarse en una forma química diferente a la de la especie de interés, permitiendo así cuantificar especies de estructuras desconocidas o de las que no se disponen patrones comerciales isotópicamente marcados.¹⁹⁶ Por el contrario, la ID específica requiere que se conozca previamente la forma química del elemento, ya que el trazador debe estar marcado isotópicamente en la misma forma. Este método es una excelente alternativa en la cuantificación precisa de especies elementales.^{197,198}

I.6. Referencias Bibliográficas

1. D. Tran, A.J. Moody, A.S. Fisfer, M. E. Foulkes, A.N. Jha. *Acquat Toxicol.*, 84 (2007) 11.
2. A. Cabanero, Y. Madrid, C. Cámara. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 4461.
3. K.T. Suzuki, Y. Ogra. *Phosphorus Sulphur*, 171 (2001) 135.
4. A.S. El-Sharakly, A.A. Newairy, M.M. Baldreldeen, S.M. Eweda, S.A. Sheweita. *Toxicology*, 235 (2007) 185.
5. K. Schwarz, J. G. Bieri. G.M. Briggs, M.L. Scout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 95 (1957) 621.
6. J. Rotruck, A. Pope, H.E. Ganther, A.B. Swason, D.G. Hafeman, W.G. Hoestra. *Science*, 179 (1973) 588.
7. L. Flohé, W.A. Gunzler, H.H. Schock. *Letters*, 32 (1973)132.
8. K. Bierla, M. Dernivies, V. Vacchina, J. Szpunar, G. Bertin, R. Lobinski. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390 (2008) 1789.
9. S. Castellano. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790 (2009)1463.
10. G.V. Kryukov, S. Castellano, S.V. Novolselov, A.V. Lobanov, O. Zehtab, R. Guigo, V.N. Gladyshev. *Science*, 300 (2003)1439.
11. E.S.J. Arner. *Exp. Cell. Res.*, 316 (2010)1296.
12. L. Johansson, G. Gafvelin, E.S.J. Arner. *Biochim. Biophys Acta*. 1726 (2005) 1.
13. J. Flohé, R. Brigelius-Flohé, A. Böck, R. Gänther, O. Meyer, L. Flohé. *Biol. Chem.*, 381 (2000) 849.
14. H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew. *Biomed. Pharmacother.*, 57 (2003) 134.
15. F.F. Chu, J.H. Doroshov, R.S. Esworthy. *J. Biol.Chem.*, 268 (1993) 2571.
16. I.D. Bhattacharya, M.F. Picciano, J.A. Milner. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 18 (1988) 59.
17. V.N. Gladyshev, D.L. Haltfield. *J. Biomed. Science*, 6 (1999) 151.
18. F. Ursini, M. Maiorino, C. Greogolin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 839 (1985) 62.
19. J.P. Thomas, P.G. Geiger, M. Maiorino, F. Ursini, A.W. Giroti. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1045 (1990) 252.
20. A. Holmgren. Selenoproteins of the thioredoxin system. En: *Selenium: Its molecular biology and role in human health*. D.L. Haltfield (Ed). Kluwer Academic Publishers (2001).
21. A. Gallegos, M. Berggren, J.R. Gasdaska, G. Powis. *Cancer Res.*, 57 (1997) 4965.
22. P.R. Larsen, M.J. Berry. *Ann. Rev. Nutr.*, 15 (1995) 323.
23. D.L. Germain. Selenium, deiodinases and endocrine functions. En: *Selenium: Its molecular biology and role in human health*. D.L. Haltfield (Ed). Kluwer Academic Publishers (2001).
24. M.J. Berry, L. Banu, Y.Y. Chen, S.J. Mandel, J.D. Kieffer, J.W. Harney, P.R. Larsen. *Nature.*, 353 (1991) 273.
25. S.G. Patching, P.H.E. Gardiner. *J. Trace Elem. Biol.*, 13 (1999) 193.

26. K.T. Suzuki, K. Ishiwata, Y. Ogra. *Analyst.*, 124 (1999) 1749.
27. G.E. Arteel, H. Sies. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 10 (2001) 153.
28. S.Y. Yu, Y.J. Zhu, W.G. Li. *Am. J. Epidemiol.*, 150 (1999) 367.
29. W.C. Hawkes, L. Hornbostel. *Biol. Psychiatry.* 39 (1996) 121.
30. J.E. Spallholz. *The Bulletin of selenium-tellurium Development Association.* 2001, May, 1.
31. A. Roveri, M. Maiorino, C. Nisicii, F. Ursini. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1208 (1994) 211.
32. A. Roveri, C. Casasco, M. Maiorino, P. Dalan, A. Calligaro, F. Ursini. *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 6142.
33. B. Xu, S.E. Chia, M. Tsakok, C.N. Ong. *Reprod. Toxicol.*, 7 (1993) 613.
34. M.A. Beck. *Selenium as antiviral agent.* En: *Selenium its molecular biology and role in human health.* D.L. Hatfield (Ed). Kluwer Academic Publishers (2001).
35. M.A. Beck, H.K. Nelson, Q. Shi, P. Van Dael, E.J. Schiffrin, S. Blue, D. Barclay, O.A. Levander. *FASEB J.*, 15 (2001) 32.
36. M.K. Baum, A. Campa, M.J. Miguez Burbano, X. Burbano, G. Shor-Posner. *Role of selenium in VIH/AIDS.* En: *Selenium its molecular biology and role in human health.* D.L. Hatfield (Ed). Kluwer Academic Publishers (2001).
37. M.K. Baum, G. Shor-Posner, S. Lai. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 15 (1997) 370.
38. J.W. Barrington, M. Taylor, S. Smith, A. Roberts. *J. Obstet. Gynecol.*, 17 (1997) 199.
39. D. Behne, H. Weiler, A. Kyriakopoulos. *J. Reprod. Fertil.*, 106 (1996) 291.
40. N.B. Oldereid, Y. Tomasen, K. Purvis. *Human Reprod.*, 13 (1998) 2172.
41. R. Scout, A. MacPherson. *Br. J. Urol.*, 82 (1998) 76.
42. C. Abad, M.J. Amengual, J. Gosálvez, K. Coward, N. Hannaoui, J. Benet, A. García-Peiró, J. Prats. *International Journal of Andrology*, 45 (2013) 211.
43. J. Néve, *J. Cardiovasc. Risk.*, 3 (1996) 42.
44. J. Joseph, J. Loscalzo. *Nutrients*, 5 (2013) 340.
45. C. Berr, B. Balansard, J. Arnaud, A.M. Roussel, A. Alperovitch. *J. Am. Geriat. Soc.*, 48 (2000) 1285.
46. L.C. Clark, G.F. Combs, B.W. Turnbull, E.H. Slate, D.K. Chalker, J. Chow. *J. Am. Med. Assoc.*, 276 (1996) 1957.
47. R.C. McKenzie, T.S. Rafferty. *Effects of selenium on immunity and aging.* En: *Selenium its molecular biology and role in human health.* D.L. Hatfield (Ed). Kluwer Academic Publishers (2001).
48. C. Ip. *J. Nutr.*, 128 (1998) 1845.
49. L. Yan, L.C. DeMars, *Int. J. Cancer*, 131 (2012) 1260.

50. A.J. Duffield-Lillico, M.E. Reid, B.W. Turnbull, G.F. Combs, E.H. Slate, L.A. Fischbach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Pre.*, 11(2002) 630.
51. A.J. Duffield-Lillico, B.L. Dalkin, M.E. Reid, B.W. Turnbull, E.H. Slate, E.T. Jacobs, J.R. Marshall, L.C. Clark. *BJU Int.*, 91 (2003) 608.
52. S. Stranges, J.R. Marshall, R. Natarajan, R.P. Donahue, M. Trevisan, G.F. Combs, F.P. Cappuccio, A. Ceriello, M.E. Reid. *Ann. Intern. Med.*, 147 (2007)217.
53. N. Karunasinghe, D.Y. Han, S.T. Zhu, H. Duan, Y.J. Ko, J.F. Yu, C.M. Triggs, L.R. Ferguson. *Nutr. Cancer*, 65 (2013) 355.
54. C. Ip, D.J. Lisk. *Carcinogenesis*, 15 (1994) 573.
55. C. Ip, Y. Dong. *Anticancer Res.*, 21 (2001) 863.
56. J.W. Findley, C.D. Davis, Y. Feng, *J. Nutr.*, 103 (2000) 2384.
57. S. Sugie, T. Tanaka, K. El-Bayoumy. *J. Health. Sci.*, 46 (2000) 422.
58. J.H. Zhang, L. Wang, G.X. Li, L.B. Anderson, Y.J. Xu, B. Witthuhn, J.X. Lu. *Nutr. Cancer*, 63 (2011) 778.
59. M.P. Rayman. *Proc. Nutr. Soc.*, 64 (2005)527.
60. R. Brigelius-Flohé. *Chem. Biodivers.*, 5 (2008)389.
61. C.D. Irons, B.A. Carlson, D.L. Hatfield. *J. Nutr.*, 136 (2006) 1311.
62. D.L. Hatfield, M.H. Yoo, B.A. Carlson, V.A. Gladyshev. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790 (2009) 1541.
63. K.M. Barnes, J.K. Evenson, A.M. Raines, R.A. Sunde. *J. Nutr.*, 139 (2009)199.
64. R.A. Sunde, A.M. Raines, K.M. Barnes, J.K. Evenson. *Biosci. Rep.*, 29 (2008) 329.
65. J. Wang, R.S. Houk, D. Dreessen, D.R. Wiederin. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 4 (1999) 546.
66. U. Schweizer, A.U. Brauer, J. Kohrle, R. Nitsch, N.E. Savaskan. *Brain Res. Rev.*, 45 (2004) 164.
67. D. Behne, C. Weiss-Nowak, M. Kalcklosch, C. Westpahl, H. Gessner, A. Kyriakopoulos. *Analyst.*, 120 (1995) 823.
68. H. Hartikainen. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 18 (2005) 309.
69. O. Levander. Evolution of human dietary standards for selenium. En: *Selenium: Its molecular biology and role in human health*. D.L. Hatfield (Ed). Kluwer Academic Publishers (2001).
70. R.J. Coppinger, A.M. Diamond. Selenium deficiency and human disease. En: *Selenium its molecular biology and role in human health*. D.L. Hatfield. (Ed.). 2001 Kluwer Academic Publishers.
71. C. Thiry, Y.J. Schneider, L. Pussemier, L. De Temmerman, A. Ruttens, *Biol. Trace Elem. Res.*, 152 (2013) 152.

72. U. Tinggi. *Toxicol. Lett.*, 137 (2003) 103.
73. P.M. Cumbie, S.L. Van Horn. *Proceedings of Annual Conference of Southeastern Assoc. Fish Wildlife Agencies* (1978).
74. A.D. Lemly. *Aquat. Toxicol.*, 57 (2002) 39.
75. G.F. Combs. *Br. J. Nutr.*, 85 (2001) 517.
76. O.E. Olson. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 5 (1986) 45.
77. G.Q. Yang, S. Yin, R. Zhou, L. Hu, B. Yan, Y. Lu, Y. Liu. *Am. J. Clin. Nutr.*, 37 (1983) 872.
78. M.E. Reid, M.S. Stratton, A.J. Lillico, M. Fakih, R. Natarajan, L.C. Clark, J.R. Marshall. *Elem. Med. Biol.*, 18 (2004) 69.
79. L. Fishbein. *Fund. Appl. Toxicol.*, 3 (1983) 411.
80. L. Fishbein. En: *Metals and their compounds in the environment*. E. Merian (Ed.) 1991. VCH Publishers.
81. G.A. Cutter. *Anal. Chem.*, 57 (1985) 2951.
82. M.P. de Souza, E.A.H. Pilon-Smits, N. Terry En: *Phytoremediation of Toxic Metals: Using plants to clean up the environment*. I. Raskin, B.D. Ensley (Ed). (2000) 171.
83. B. G. Bennet. *Sci. Total Environ.*, 31 (1983) 117.
84. A.D. Lemly. En: *Selenium assesment in aquatic ecosystems, a guide for hazard evaluation and water quality criteria*. New York, Springer Verlag, (2002).
85. D.G. Barceloux. *Clin. Toxicol.*, 37 (1999) 245.
86. <http://water.epa.gov/drink/info/well/index.cfm>
87. P.M. Fox, D.L. LeDuc, H. Hussein, Z. Lin, N. Terry. *ACS Symp. Ser.*, 835 (2003) 339.
88. J.E. Legget, E. Epstein. *Plant Physiol.*, 31 (1956) 222.
89. R.D. Reeves, A.J. Baker. En: *Phytoremediation of Toxic Metals: Using plants to clean up the environment*. I. Raskin, B.D. Ensley (Ed) (2000) 193
90. M.M. Lasat. *J. Environ. Qual.*, 31 (2002) 109.
91. R. D. Ellis, E.D. Salt. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6 (2003) 273.
92. M. Montes-Bayón, D.L. LeDuc, N. Terry, J.A. Caruso. *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 872.
93. X. Guo, L.Wu. *Ecotox. Environ. Safe.*, 39 (1998) 207.
94. E. Kápolna, K.H. Laursen, S. Husted, E.H. Larsen. *Food Chemistry* 133 (2012) 650.
95. G.S. Bañuelos, S.S. Walse, S.I. Yang, I.J. Pickering, S.C. Fakra, M.A. Marcus, J.L. Freeman, *Anal. Chem.*, 84 (2012) 6024.
96. X. Dauchy, M.P. Gautier, A. Astruc, M. Astruc. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 384 (1994) 792.
97. B. Neuhierl, A. Bock. *Eur. J. Biochem.*, 239 (1996) 235.
98. A.M. Carey, K.G. Scheckel, E. Lombi, M. Newville, Y. Choi, G.J. Norton, A.H. Price, A.A. Meharg, *Environ. Sci. Technol.*, 46 (2012) 5557.

99. B. Lewis. *Plant Soil*, 40 (1974) 107.
100. T. Xue, H. Hartikainen, V. Piironen. *Plant Soil*, 237 (2001) 55.
101. M. Djanaguiram, D. Durga, A. K.Shanker, J. A. Sheeba, U. Nangarusamy. *Plant Soil*, 272 (2005) 77.
102. P. Cartes, L. Gianfreda, M.L. Mora. *Plant Soil*, 276 (2005) 359.
103. M.Seppanen, M. Turkainen, H.Hartikainen. *Plant Sci.*, 165 (2003) 311.
104. B. Breznik, M. Germ, A. Gaberscik, I. Kreft. *Photosynthetica*, 43 (2005) 583.
105. R.L. Prior, G.H. Cao. *Hortscience*, 35 (2000) 588.
106. S. Munné-Bosch, L. Alegre. *Critic. Reviews Plant Sci.*, 21 (2002) 31.
107. S. Munné-Bosch. *J. Plant Physiol.*, 162 (2005) 743.
108. K. Liu, Y. Zhao, F. Chen, Z. Gu, G. Bu. *Eur. Food Res. Technol.*, 234 (2012)61.
109. A. Pennane, T. Xue, H. Hartkainen. *J. Appl. Bot.*, 76 (2002) 66.
110. M. Turkainen, H. Hartikainen, M. Sepanen. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 5378.
111. J.Chu, X. Yao, Z. Yue, J. Li, J. Zhao. *Biol. Trace Elem. Res.*, 151 (2013) 434.
112. M. Djanaguirman, D.D. Durga, A.K. Shanker, U. Bangarusamy. *J. Agric. Res. Manage.*, 3 (2004) 1.
113. Y. Huang, J. Xu, Q. Hu. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 7444.
114. L. Zhang, Q. Li, X. Yang, Z. Xia. *Biol. Trace Elem. Res.*, 146 (2012) 376.
115. R. Fenga, C. Weic, S. Tu. *Environmental and Experimental Botany*, 87 (2013) 58.
116. C.C. Chery, H. Chassaigne, L. Verbeeck, R. Cornelis, F. Vanhaecke, L. Moens. *J. Anal. At. Spectrom.*, 17 (2002) 576.
117. A.H.Serafín Muñoz, K. Wrobel, F.G. Corona, K. Wrobel. *Mycol. Res.*, 5 (2007) 626.
118. R.M. Smith. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. Academic Press, New York (1983).
119. National Research Council (NRC). *Nutrient requirements of fish*. Washington, D.C. National Academy Press (1993),
120. A.J. Niimi, Q.N. Laham. *Canadian Journal of Zoology*, 54 (1976) 501.
121. E.Dumont, F. Vanhaecke, R.Cornelis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006) 1304.
122. A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara. *Anal. Chim. Acta*, 526 (2004) 51.
123. S. Yoshida, M. Haratake, T.i Fuchigami, M. Nakayama. *Chem. Pharm. Bull.*, 60 (2012) 348.
124. L. Gong , Q. Xu , C. Lee, H. Zhang. *Eur. Food Res. Technol.*, 235 (2012) 169.
125. Environmental Protection Agency (US EPA). *Draft Aquatic Life Water Quality Criteria for Selenium (2004)*. US EPA Office of water, Washington, DC, (EPA- 822-D-04-001).
126. R.J. Reash, T.W. Lohner, K. V. Wood. *Environm. Pol.*, 142 (2006) 397.
127. S. J. Hamilton. *Sci. Total. Environm.*, 326 (2004) 1.

128. M. Sandholm, H.E. Oksanen, L. Pesonen. *Limn. Oceanogr.*, 18 (1973) 496.
129. D. Han, S. Xie, M. Liu, X. Xiao, H. Liu, X. Zhu, Y. Yang. *Aquaculture Nutrition*, 17 (2011) E741.
130. V. Días Huerta, M.L. Fernández, A. Sanz-Medel. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 644.
131. A.I. Cabañero, C. Carvalho, Y. Madrid, C. Batoreu, C. Cámara, *Biol. Trace Elem. Res.* 103 (2005) 17.
132. P. Moreno, M.A. Quijano, A.M. Gutiérrez, M.C. Pérez-Conde, C. Cámara, *Anal. Chim. Acta*, 524 (2004) 315.
133. Y. Yamashita, M. Yamashita. *J. Biol. Chem.*, 285 (2010) 18134.
134. E.C. Pappa, A.C. Pappas, P.F. Suraj, *Sci. Total Environ.*, 372 (2006) 100.
135. C. Thiry, A. Ruttens, L. De Temmerma, Y.J. Schneide, L. Pussemier. *Food Chemistry*, 130 (2012) 767.
136. A. Tenuta Filho, L.F.L. Macedo, D.I.T. Favaro. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 30 (2010) 210.
137. A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara. *Biol. Trace Elem. Res.*, 119 (2007) 195.
138. P. Smrkolj, L. Pograjc, C. Hlastan-Ribic, V. Stibilj. *Food Chem.*, 90 (2005) 691.
139. Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. National Academy Press, Washington, DC (2000) 284.
140. M. Navarro- Alarcón, M.C. López-Martín. *Sci. Total Environ.*, 249 (2000) 347.
141. C.R. Stockdale, P.M. Shields, A. McKenna, G. P. Walker, F.R. Dunshea, P.T. Doyle. *J. Dairy Sci.*, 94 (2011) 262.
142. M. Corola, A. Vainio, K. Edelman, *Ann. Clin. Res.*, 18 (1986) 65.
143. C.A. Ponce de León, M.M. Bayón, C. Paquín, J.A. Caruso. *J. Appl. Microbiol.*, 92 (2002) 602.
144. L. Hinojosa Reyes, F. Moreno Sanz, P. Herrero Espílez, J. M. Marchante-Gayón, J.I. García Alonso, A. Sanz-Medel. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 1230.
145. P. Ward, C. Connolly, R. Murphy. *Biol. Trace Elem. Res.* 151 (2013) 446.
146. O. Stabnikovaa, V. Ivanova, I. Larionovab, V. Stabnikov, M.A. Bryszewskac, J. Lewis. *LWT*, 41 (2008) 890.
147. Z. Pedrero, Y. Madrid, C. Cámara. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 2412.
148. L. Chen, F. Yang, J. Xu, H. Yun, Q. Hu, Y. Zhang, G. Pan. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 5128.
149. M.J. Poblaciones, S.M. Rodrigo, O. Santamaría. *Biol. Trace Elem. Res.*, 151 (2013) 132.
150. S. Arscott, I. Goldman. *Hortscience*, 47 (2012) 497.
151. P.J. White, M.R. Broadky. *Trends of Plants Science*, 10 (2005) 586.
152. M.H. Campos-Bowers, B.F. Wittenmyerr. *Health Research Policy and System*, 5 (2007) 10.

153. J.W. Finley. *Nutr. Rev.*, 64 (2006) 146.
154. R.M. Welch. *J. Nutr.*, 132 (2002) 495.
155. S. Poletti, W. Guissem, C. Sautter. *Current Opinion in Biotechnology*, 15 (2004) 162.
156. G. Lyons, I. Ortiz-Monasterio, J. Stangoulis, R. Graham. *Plant and Soil*, 269 (2005) 369.
157. R.M. Welch. *J. Nutr.*, 132 (2002) 495.
158. M.R. Aluru, S.R. Rodermel, M.B. Reddy, *J. Agric. Food Chem.*, 59 (2011) 12954.
159. D.A. Brummell, L.M. Watson, R. Pathirana, N.I. Joyce, P.J. West, D.A. Hunter, M.J. McKenzie. *J. Agric. Food Chem.*, 59 (2011) 10987.
160. D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.G. Danielsson, H. Muntau, H.P. Van Leeuwen, R. Lobinski. *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000)1453.
161. A.L. Rosen, M. Hieftje. *Spectrochim. Acta B.*, 59 (2004) 135.
162. T. Lindemann, A. Prange, W. Dannecker, B. Neidhart. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 368 (2000) 214.
163. A.A. Shaltouta, I.N.B. Castilho, B. Welza, E. Caraseka, I.B. Gonzaga Martens, A. Martens, S.M.F. Cozzolino. *Talanta*, 85 (2011) 1350.
164. R. Toniolo, F. Tubaro, S. Bin, A. Pizzariello, S. Susmel, N. Dossi, G. Bontempelli. *Talanta*, 789 (2009) 753.
165. Q.X. Zhao, Y.W. Chen, N. Belzile, M.Wang. *Anal. Chim. Acta*, 665 (2010) 123.
166. F. Priego-Capote, M. D. Luque de Castro, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70 (2007) 299.
167. A. Holmgren. Selenoproteins of the thioredoxin system. En: *Selenium: Its molecular biology and role in human health*. D.L. Haltfield (Ed). Kluwer Academic Publishers (2001).
168. D. Behne, C. Hammel, H. Pfeifer, D. Rothlein, H. Gessner, A. Kyriakopoulos. *Analyst.*, 123 (1998) 871.
169. J. Ruiz Encinar, L. Ouerdane, W. Buchmann, J. Tortajada, R. Lobinski, J. Szpunar. *Anal. Chem.*, 75 (2003), 3765.
170. K. Bierla, J. Szpunar, R. Lobinski, *Anal. Chim. Acta*, 624 (2008) 195.
171. C.B Hymer, J.A. Caruso. *J. Chromatogr. A.*, 1114 (2006) 1.
172. P. Cuderman, L. Ozbolt, I. Kreft, V. Stibilj. *Food Chemistry*, 123 (2010) 941.
173. D.H. Holben, A.M. Smith. *J. Am. Diet. Assoc.*, 99 (1999) 836.
174. W. Wang, Z. Chen, D.E. Davey, R. Naidu, *Microchim Acta*, 165 (2009)167.
175. H.G Kristinsson, B.A. Rasco. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition*. 40 (2000) 43.
176. S.I. Aspomo, S.J.Horn, V.G. H Eijsink. *Process Biochemistry*, 40 (2005) 1957.
177. G. Vale, A. Rodrigues, A. Rocha, R. Rial, A.M. Mota, M.L. Gonçalves, L.P. Fonseca, J.L. Capelo, *Food Chemistry* 121 (2010) 268.

178. A. Montaser, J.A. McLean, H. Liu, J.M. Memet. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. A. Montaser (Ed). New York (1998).
179. I. Feldmann, M. Jakubowski, D. Stuewer, C. Thomas. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 15 (2000) 371.
180. C. Thomas, M. Jakubowski, D. Stuewer, D. Kolckow, H. Emons. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 13 (1998) 1221.
181. F.A. Kero, L.R. Moore, J. Malson. *Spectroscopy*, 27 (2012) 24.
182. G. Álvarez-Llamas, M. R. Fernández de la Campa, A. Sanz-Medel. *Trends. Anal. Chem.*, 24 (2005) 28.
183. D. Kremer, G. Ilgen, J. Feldmann. *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 509.
184. Yang, R.E. Sturgeon, W.R. Wolf, R.J. Goldschmidt, Z. Mester. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 19 (2004) 1448.
185. C. Ponce de León, M. Montes-Bayón, J. A. Caruso. *J. Chrom. A.*, 974 (2002) 1.
186. N. Zhong, R. Wang, H.H. Yang, X. Cao, G. Wang. *Chemical Journal of Chinese Universities Chinese*, 29 (2008) 77.
187. L. Hinojosa Reyes, J. Ruiz Encinar, J. M. Marchante Gayón, J.I. García Alonso, A. Sanz-Medel. *J. Chrom. A.*, 1110 (2006) 108.
188. F. Cubadda, F. Aureli, S. Ciardullo, M. Damato, A. Raggi, R. Acharya, R.A.V. Reddy, N. Tejo Prakash. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (2010) 2295.
189. Q. Chan, J.A. Caruso. *Anal. Bioanal. Chem.*, 403 (2012) 1311.
190. F. Aureli, L. Ouerdane, K. Bierla, J. Szpunar, N. Tejo Prakashc, F. Cubadda. *Metallomics*, 4 (2012) 968.
191. C. Arnaudguilhem, K. Bierla, L. Ouerdane, H. Preud'homme, A. Yiannikouris, R. Lobinski, *Anal. Chim. Acta*, 757 (2012) 26.
192. Y. Ogra, A. Katayama, Y. Ogihara, A. Yawata, Y. Anan. *Metallomics*, 5 (2013) 429.
193. J. Ruiz Encinar, R. Ruzik, W. Buchmann, J. Tortajada, R. Lobinski, J. Szpunar. *Analyst.*, 128 (2003) 220.
194. L. Tastet, D. Schaumlöffel, B. Bouysiere, R. Lobinski. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006) 948.
195. K.G. Heumann. *Mass Spectrom.*, 11 (1992) 41.
196. C. Swart, O. Rienitz, D. Schiel. *Talanta*, 83 (2011) 1544.
197. L. Yang, P. Maxwell, Z. Mester, *Analytical Methods*, 5 (2013) 525.
198. H. Goenaga-Infante, *Metrologia*, 47 (2010) 08012.

II. Nanopartículas Inorgánicas. Nanopartículas de Selenio y Nanopartículas de Dióxido de Titanio



Las nanopartículas (NPs) y los nanomateriales (NMs) se definen como materiales de al menos una dimensión cuyo tamaño está comprendido entre 1 y 100 nm.¹ Debido a su pequeño tamaño, estos pueden presentar diferentes propiedades físico-químicas respecto a los correspondientes materiales “*bulk*” (de mayor volumen y masa).

Se producen modificaciones de sus propiedades ópticas (razón por la cual se observan cambios en el color de las nanopartículas), en su comportamiento térmico, resistencia material, solubilidad, conductividad y actividad (foto)catalítica.²⁻⁴ Este comportamiento, que convierte a las NPs en materiales tan “especiales”, está principalmente influenciado por su elevada relación área superficial/volumen,⁵ y por la presencia de numerosos defectos superficiales y sitios catalíticamente activos,⁶ características que hacen que la reactividad de las NPs sea aproximadamente 1000 veces superior respecto a las micropartículas o materiales “*bulk*”. Además, esta reactividad puede ser fácilmente modificada mediante el recubrimiento o la funcionalización de su superficie.

En las próximas secciones se detallan algunas de las aplicaciones más importantes de las NPs y MNs, así como una discusión de su impacto en diversas áreas de interés científico.

II.1. Aplicación de las Nanopartículas

El desarrollo de la nanotecnología ha supuesto una nueva vía de mejora de materiales. Entre todas las características citadas en el apartado anterior, quizás la propiedad que convierte a estos NMs en productos tan demandados sea su gran aplicabilidad. Actualmente, las NPs son utilizadas en multitud de áreas, desde aplicaciones médicas como medio ambientales, dando lugar a un amplio abanico de posibilidades. En este sentido, más de 200 compañías en todo el mundo (en Estados Unidos, Japón y Europa) están focalizando su investigación en el desarrollo de nuevos productos basados en la nanotecnología.⁷

A continuación, y tal y como aparece esquematizado en la Figura 5, se clasifican las aplicaciones y NPs más utilizadas, clasificadas en función de su composición química. La información recogida nos ayuda a entender cómo el uso de NPs ha supuesto una ventaja tanto desde el punto de vista de la industria, como para el consumidor:

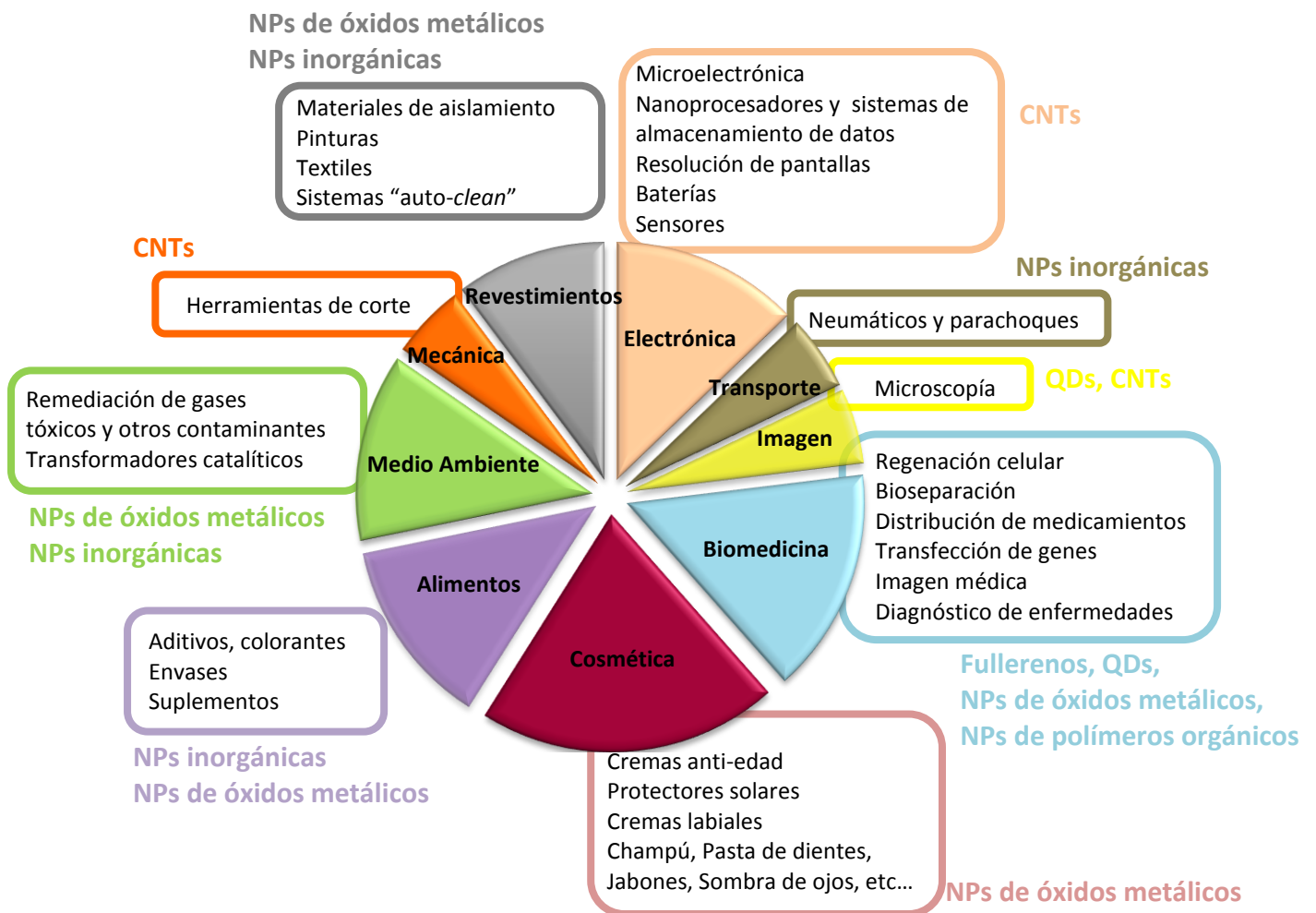


Figura 5. Esquema de las NPs empleadas y sus aplicaciones en diversos sectores de la industria.

Aplicaciones Electrónicas: Los NMs son utilizados en microelectrónica, consiguiendo una reducción significativa del tamaño de los elementos de un circuito. Un ejemplo de esto son los nanoprocesadores que proporcionan una mayor rapidez en el procesamiento de datos, y los dispositivos de almacenamiento de datos que aumentan la capacidad de almacenamiento de información. Además, existen nuevos NMs que actualmente se están empleando en el desarrollo de baterías y sensores. Estos últimos son utilizados para la detección de varios parámetros como la resistencia eléctrica, conductividad térmica y capacidad, actividad química.⁸

Dentro de este sector los **nanotubos de carbono (CNTs)** son muy utilizados. Sus propiedades eléctricas, mecánicas y químicas los convierten en excelentes materiales para electrónica, entre otras aplicaciones.⁹

Aplicaciones Biomédicas: Dentro de esta área se está desarrollando la utilización de nanofibras (“nanoandamios”) como sitios de unión para regenerar células del sistema nervioso central y otros órganos. Ciertos nanopolvos, como NPs de Ag y TiO₂, son comúnmente utilizados en el revestimiento de mascarillas quirúrgicas debido a su efecto antimicrobiano.¹⁰ Las membranas de nanotubos son utilizadas en bio-separación actuando como canales para el transporte selectivo de moléculas e iones.¹¹ La capacidad de las NPs para penetrar en células y órganos se puede explotar desde el punto de vista de la biomedicina ya que de esta forma se facilita la liberación de medicamentos en sitios diana.¹² Las NPs también son utilizadas en la distribución del material genético dentro de células. Además, la detección de proteínas y secuencias de ADN, recurso muy utilizado en el diagnóstico de enfermedades, se realiza mediante ensayos basados en NMs.¹³

Otras nanoestructuras basadas en carbono, los **fullerenos**, son muy utilizadas en este tipo de aplicaciones.¹⁴ En biomedicina también cabe destacar el uso de **NPs de óxidos metálicos**. Este grupo de NPs comprende a una amplia variedad de óxidos de metales de transición (**Fe₂O₃, CuO, TiO₂, ZnO, CeO**), incluyendo a las NPs de **SiO₂**.¹⁵⁻¹⁷ Las propiedades paramagnéticas de las NPs de Fe₂O₃ han sido de gran utilidad en numerosas aplicaciones in vivo (reparación de tejidos, inmunoensayos, liberación de fármacos, etc...).¹⁸ Las propiedades fluorescentes de los **Quantum Dots (QDs)**, nanocristales semiconductores constituidos por dos metales (**CdSe, CdS, CdZn, etc...**), los convierten en materiales muy adecuados en aplicaciones de diagnóstico. A parte de las NPs inorgánicas, es importante destacar las **NPs de polímeros orgánicos**. La naturaleza de estas NPs y su elevada estabilidad en fluidos biológicos les confieren unas propiedades óptimas que son explotadas en ensayos biomédicos.¹⁹

Aplicaciones Medio Ambientales: Se usan en la remediación de contaminantes, ya que debido a su extraordinaria reactividad química, los NMs pueden ser usados como catalizadores para reaccionar con gases tóxicos (CO y NO_x), en transformadores catalíticos de automóviles y equipos de generación de energía.²⁰ Los nanotubos funcionalizados se utilizan en la eliminación de moléculas específicas de disoluciones.²¹ Actualmente, se está investigando la capacidad de las NPs para reaccionar con contaminantes en el aire, suelo y agua y transformarlos en compuestos menos peligrosos (desarrollo de pinturas que absorben los gases nocivos de los tubos de escape).²⁰

Las **NPs inorgánicas** (compuestas por elementos metálicos como **Ag, Au, Fe, Mg y Zn**, incluyendo no metales como el **Se**) se usan en multitud de aplicaciones: en remediación, catálisis, desarrollo de energías renovables (paneles solares), detección de biomoléculas, etc. Debido a su versatilidad, las **NPs de óxidos metálicos** también son muy utilizadas con fines medio ambientales (catálisis).¹⁵⁻¹⁷

Aplicaciones en Cosmética: Debido su habilidad para penetrar en las capas protectoras de la piel, se usan como agentes liberadores de nutrientes, por ejemplo; de péptidos sintéticos encargados de la regeneración celular.²² Algunas NPs tienen propiedades antioxidantes,²³ y por lo tanto su aplicación puede ayudar a mantener el aspecto joven de la piel. Debido a su pequeño tamaño y propiedades ópticas, se piensa que son capaces de ocultar arrugas y pequeños pliegues de la piel. En este sentido, el nanopolvo de Al₂O₃ es usado para reducir visualmente finas líneas de expresión.²⁴ Muchos productos cosméticos y de cuidado personal tienen incorporados NMs: desodorantes, jabones, pastas de dientes, champús, acondicionadores capilares, cremas, bases de maquillajes, polvos faciales, cremas labiales, sombras de ojos, laca de uñas, perfumes.²⁵

Las **NPs** más utilizadas son de **óxidos metálicos**, entre las que destacan las **NPs de TiO₂** de y **ZnO**. Ambos compuestos pueden llegar a ser transparentes a la luz visible cuando están a escala nanométrica. Son capaces de absorber y reflejar la luz ultravioleta, capacidad que los convierte en excelentes componentes de cremas solares.²⁶

Aplicaciones en Técnicas de Imagen: como componentes de sondas en microscopía de barrido, consiguiendo un aumento de la resolución, y en el reconocimiento molecular en microscopía de fuerza iónica.

La unión de biomoléculas con **CNTs** constituye una estrategia muy utilizada en bioimagen.²⁷ En este sentido, los **QDs** también son empleados para la obtención de imágenes biomédicas in vivo.²⁸⁻³¹

Materiales y Revestimientos: en sistemas de auto-limpiado de cristales (recubiertos con TiO_2), como materiales de aislamiento, en pinturas (para aumentar la resistencia de ciertos materiales a la acción corrosiva de ambientes acuáticos), y en textiles por presentar características antimicrobianas.³²

Dentro de este grupo se pueden encontrar **NPs de óxidos metálicos e inorgánicas**.

Ingeniería mecánica: en herramientas de corte para proporcionar una mayor resistencia respecto a las convencionales.³³

Las propiedades mecánicas de los **CNTs** los convierten en los NMs más adecuados para esta finalidad.

Industria alimenticia: Muchos alimentos contienen ingredientes naturales de tamaño nanométrico, como: proteínas globulares (entre 10 y 100 nm), polisacáridos lineales considerados nanoestructuras de una dimensión y, otros polisacáridos como el almidón, considerados nanoestructuras de tres dimensiones.³⁴ Además, en la industria alimenticia podemos encontrar ciertos NMs inorgánicos empleados como aditivos (SiO_2 , E551; TiO_2 , E171), como agentes “anti-coagulantes”, y en envases (ejerciendo un papel protector contra la acción microbiana y la radiación UV).³⁵

Los compuestos más utilizados son las **NPs inorgánicas (Ag y Au)** y las **NPs de óxidos metálicos (ZnO , SiO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 , Fe_3O_4 y Fe_2O_3)**.

Entre otras aplicaciones de la nanotecnología en la industria alimenticia se encuentran: la fabricación de biosensores para la identificación de bacterias y evaluación de la calidad de los productos,³⁶ el desarrollo de sistemas inteligentes para el empaquetado de alimentos,³⁷ y la nanoencapsulación de compuestos bioactivos.^{38,39}

II.2. Impacto de las Nanopartículas en Diferentes Áreas de Interés Científico

El número de publicaciones relacionadas con la nanotecnología se ha incrementado de manera exponencial desde el año 2000, alcanzando el número de 46000 publicaciones en el año 2013, según la base de datos ISI Web of Knowledge.⁴⁰ Dentro de los estudios desarrollados en diferentes áreas de interés científico, es notable el aumento del número de publicaciones relacionadas con la toxicidad, particularmente en los últimos dos años (Figura 6).

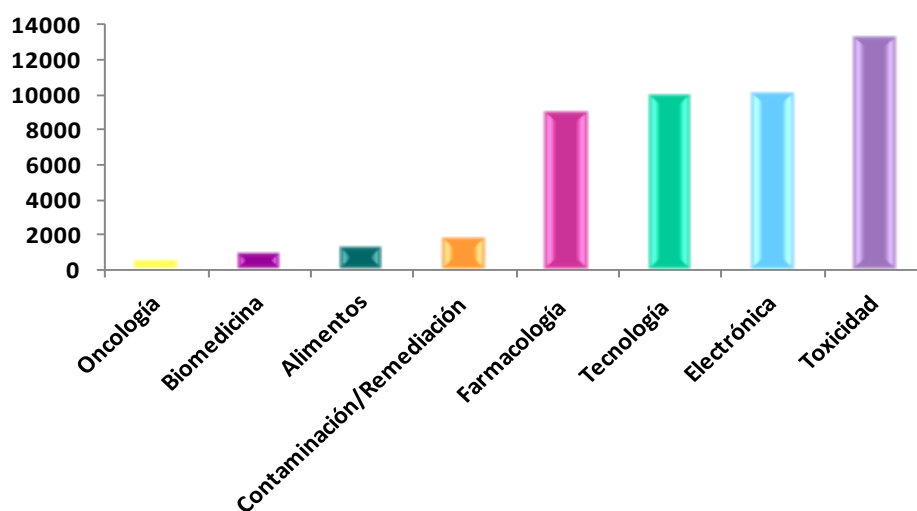


Figura 6. Representación gráfica en la que se recogen los artículos de investigación o revisiones, publicados entre el año 2000 y 2013, relacionados con la presencia o aplicación de NPs en diferentes áreas de interés científico. Un número elevado de estudios se han desarrollado en el campo de la farmacología, tecnología, electrónica y toxicidad.

Este rápido desarrollo ha derivado en discusiones científicas acerca de la seguridad de las NPs respecto a la salud humana y medio ambiente. Debido a la presencia de NPs en numerosos aspectos de la vida cotidiana, la exposición de los seres humanos de manera directa es prácticamente inevitable. Además, la liberación de NPs al medio ambiente (vértidos, basuras, aguas de desecho...) puede conllevar a una exposición indirecta.

Actualmente, la toxicidad de las NPs y sus efectos en la salud humana no están totalmente establecidos. Aunque el tamaño de las NPs constituye unos de los factores claves en la determinación de su toxicidad,⁴¹ también se deben considerar otros parámetros como: composición química, forma y morfología, estructura, carga superficial, estado de agregación, solubilidad y la presencia o ausencia de grupos funcionales.⁴² Se conoce que las NPs son capaces de atravesar las barreras biológicas y penetrar en células transportándose a tejidos y

órganos, mientras que las partículas de mayor tamaño generalmente no pueden hacerlo.⁴³ Las NPs también pueden entrar en el torrente sanguíneo, mediante su inhalación o ingestión, y algunas tras penetrar en la piel.⁴⁴ Una vez que entran en el torrente sanguíneo se transportan a diferentes partes del cuerpo y se acumulan en órganos y tejidos, como cerebro, corazón, hígado, riñones, pulmones y sistema nervioso. A nivel celular, los principales mecanismos implicados en la citotoxicidad de las NPs son la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y la consiguiente inducción al daño oxidativo.^{45,46} El estrés oxidativo celular se produce como resultado de un desequilibrio entre la producción de ROS y la defensa antioxidante celular. Además, un aumento en los niveles de ROS puede causar la disrupción de la membrana celular y mitocondrial⁴⁷ y el daño a proteínas, lípidos y ADN celular,⁴⁸ dando lugar a la muerte celular.⁴⁹ Para entender de una manera sencilla cómo las NPs son capaces de entrar en las células e interactuar con varios componentes celulares, en la Figura 7 se compara el tamaño de una célula y sus orgánulos con el tamaño de varias NPs.⁵⁰

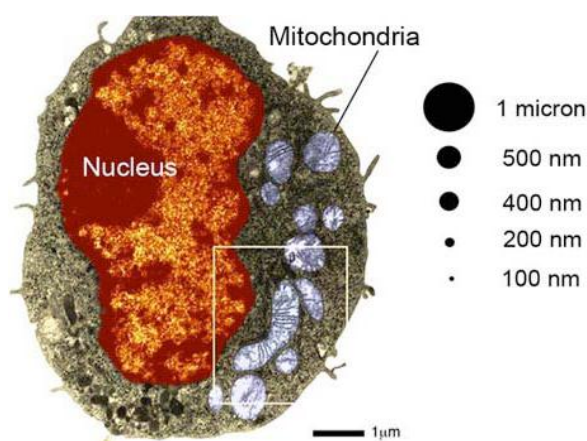


Figura 7. Comparación entre el tamaño de una célula de macrófago y NPs de varios tamaños (desde 100 nm a 1 µm).

Entre las enfermedades relacionadas con la inhalación de NPs se encuentran: asma, bronquitis, cáncer de pulmón, enfisema pulmonar, y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson. La presencia de NPs en el tracto gastro-intestinal puede estar relacionada con la enfermedad de Crohn y cáncer de colon. Las NPs que entran en el sistema circulatorio están relacionadas con la arterioesclerosis, formación de coágulos de sangre, arritmias, enfermedades del corazón y últimamente con la muerte cardíaca.⁸ La toxicidad de las NPs en el medio ambiente también ha sido estudiada en numerosas ocasiones, y se ha demostrado que se encuentra estrechamente relacionada con el tamaño de partícula.⁵¹⁻⁵⁴ Sin embargo, los mecanismos involucrados en los efectos nocivos derivados de la presencia de NPs en ecosistemas acuáticos, organismos terrestres y plantas están menos establecidos.⁵⁵⁻⁶⁰ Todos los estudios enfocados en este sentido coinciden en la importancia de evaluar la toxicidad en

términos de bioacumulación y a largo plazo. A pesar de todos los datos recogidos, resulta muy complicado generalizar sobre los riesgos asociados a la exposición de NPs, ya que cada tipo de NPs o NMs deben ser individualmente estudiados teniendo en cuenta todas sus propiedades físico-químicas. Debido a que la presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de las NPs de Se y NPs de TiO_2 , nos centraremos en el impacto toxicológico de dichos compuestos.

II.3. Nanopartículas de Selenio

Como ya se ha hecho referencia en el Capítulo I, “Selenio: Elemento Esencial”, el Se se puede encontrar en varios estados de oxidación, como selenito (SeO_3^{2-}), seleniato (SeO_4^{2-}), selenide (Se^{2-}), oxoaniones donde los estados de oxidación son +4 y +6, y Se elemental (Se^0).

Se conoce que la toxicidad de los iones metálicos puede ser reducida, o incluso eliminada, mediante la oxidación o reducción de sus estados de oxidación, dando lugar a la formación de partículas de Se^0 de tamaño nanométrico.⁶¹ Es interesante resaltar que el Se^0 constituye una de las mayores reservas en sistemas acuáticos, representando sobre el 30-60% del Se total en sedimentos. En la naturaleza la reducción de los iones Se(IV) y Se(VI) a Se^0 está controlada tanto por procesos microbiológicos como por procesos reductores.⁶²

Entre las diferentes formas alotrópicas de Se^0 , el gris (con forma hexagonal) y el negro (variedad metálica en estado muy fino de subdivisión) son considerados biológicamente inertes, debido principalmente a su baja solubilidad.^{63,64} Existe otro alótropo, caracterizado por su color rojo (que puede ser amorfo o cristalino), presente en el ambiente microbiano, conocido como Se^0 biogénico. Éste se encuentra como partículas esféricas de tamaño nanométrico (NPs de Se). En ambientes acuáticos, las NPs de Se pueden permanecer en suspensión coloidal durante semanas. Sin embargo, debido a su elevada relación superficie/volumen, su cinética de re-oxidación es mucho más rápida en comparación con otros estados de Se con tamaños de partícula mayores. Es decir, las NPs de Se expuestas a zonas aerobias o zonas en las que pueden estar sujetas a procesos de re-oxidación, se pueden transformar a Se(IV) ó Se(VI) y de nuevo ser biodisponibles. Estas partículas esféricas de tamaño nanométrico presentan una elevada tendencia a unirse a polímeros orgánicos constituidos por proteínas de origen bacteriano, siendo estos los que limitan su dispersión en el medio ambiente. Debido a las propiedades conferidas por la fracción proteica a las que se asocian (diferente naturaleza hidrofílica o potencial de superficie), y sus dimensiones nanométricas, las NPs de Se se distribuyen de manera diferente al Se^0 de mayor tamaño.⁶²

II.3.1. Aplicaciones de las Nanopartículas de Selenio

El Se⁰ cristalino (monocíclico) en escala nanométrica es un elemento de interés para aplicaciones electrónicas y fotónicas. Sus altos índices de refracción y su alta reactividad permiten el recubrimiento de su superficie con otros metales como platino y cadmio, produciéndose nanoestructuras “*core-shell*”, como celosías de opalina invertidas u otros materiales funcionales.⁶⁵

Los efectos beneficiosos del Se sobre la salud humana, puestos de manifiesto en multitud de estudios, han abierto el camino para el empleo de las NPs de Se dentro de áreas relacionadas con la biología, medicina y nanotecnología. Varios trabajos han mostrado la biodisponibilidad, elevada actividad biológica y baja toxicidad que presentan estas NPs frente a otras especies orgánicas como la SeMet o SeMetSeCys.^{64,66,67}

II.3.2. Reactividad de las Nanopartículas de Selenio: Métodos de Síntesis y Estabilización de las Dispersiones

Además de los procesos de síntesis naturales, existen otros métodos sintéticos como: exposición de ácido selenioso a la radiación gamma, reducción del ácido selenioso a varios reactivos como hidracina (N₂H₄), oxidando iones de seleniuro electroquímicamente, cristalizando Se amorfo, usando un método de micela inversa o ablación láser. Todos estos métodos de síntesis presentan algunas limitaciones, como por ejemplo: el empleo de altas temperaturas y presiones, dando lugar a NPs con una amplia distribución de tamaño.⁶⁵

Actualmente, la **síntesis de NPs de Se basada en reacciones redox** se considera el método más adecuado para su posterior aplicación en biomedicina. Estos procedimientos de síntesis se basan en la reacción entre un compuesto de Se y un agente reductor. Son conocidos como métodos “verdes”, ya que se produce la interacción entre las NPs sintetizadas y biomacromoléculas (polisacáridos hiperramificados (HBP), dendrímeros...)⁸⁸ Frente a los procesos químicos tradicionales, presentan las siguientes ventajas: reacciones a temperatura ambiente, empleo de medios acuosos y pH neutro. Shen y col. sintetizaron complejos dextrano-NPs de Se, con un tamaño medio de 36 nm, para su posterior aplicación en

nanomedicina.⁸⁹ Como reactivo precursor suele emplearse el Se(IV), y entre los agentes reductores más comunes se encuentra el GSH y el ácido ascórbico.^{70,71} El hidrato de hidracina también se ha utilizado como agente reductor en presencia de dióxido de selenio y el

surfactante catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, *hexadecyltrimethylammonium bromide*). El resultado fue la formación de NPs de Se con un tamaño de tan sólo 16 nm.⁷² Uno de los inconvenientes que presenta este tipo de síntesis es que la introducción de agentes reductores al medio de reacción puede generar productos secundarios, lo que requiere una purificación que puede limitar las investigaciones realizadas sobre las NPs y sus futuras aplicaciones.⁷³

La **estabilidad** de las NPs constituye otro factor a tener en cuenta. La dispersión de NPs de Se suele ser inestable en ausencia de modificadores que controlen la síntesis (agentes estabilizantes), dando lugar a la agregación y consecuente transformación de las NPs a Se gris o negro. La función principal de estos modificadores es ayudar en la formación de NPs de Se de color rojo (recordemos que son las más bio-activas), estables, dispersas, y de un tamaño definido y controlado. La estabilización de las dispersiones, en la mayoría de los casos, se basa en el recubrimiento de las NPs impidiendo de esta forma el crecimiento y agregación de las mismas. En este sentido, proteínas como **albúmina de suero bovino** (BSA, *Bovine Serum Albumine*),^{70,74} **monosacáridos** (glucosa), **oligosacáridos** (sucrosa), y **polisacáridos** (U. pinnatifida, chitosan (CS) y eucheuma striatum sulfatado (ESS))^{67,75,76} son los más empleados para modificar la superficie de las NPs de Se y controlar su diámetro. La formación de nanoestructuras BSA-Se⁰ es el resultado de la combinación de las interacciones hidrofóbicas producidas entre las áreas apolares de la proteína y las zonas de alta reactividad de la superficie de las NPs, y de las interacciones electrostáticas intermoleculares fomentadas por la naturaleza poli-anfófila de la proteína.⁷⁷ Por otro lado, los sacáridos son capaces de modular la formación de NPs de Se en términos de diámetro, tamaño y morfología. Se ha demostrado que esta modificación es fuertemente dependiente del tamaño y de la estructura molecular del sacárido empleado. En este sentido, la estabilización ejercida por los polisacáridos es mayor que la de los oligosacáridos, y ésta a su vez mayor que la de los monosacáridos (Figura 8).

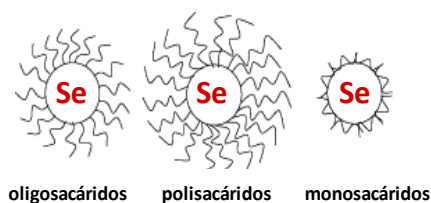


Figura 8. Estabilización de las NPs de Se en función del tamaño y de la estructura molecular del sacárido empleado en la reacción de síntesis.

Otro motivo por el cual se puede concluir que los polisacáridos son más eficaces en la estabilización de las NPs reside en la fortaleza de los enlaces de hidrogeno formados. Los polisacáridos CS o ESS (Figura 9) tienen una conformación espacial con un gran número de

grupos hidroxilos orientados para formar una estructura de red, e impedir de esta forma, la difusión del ácido selenico (H_2SeO_3) formado en la reacción. Ambos polisacáridos son capaces de recubrir las NPs de Se dando lugar a dispersiones estables durante un largo periodo de tiempo.⁷⁸

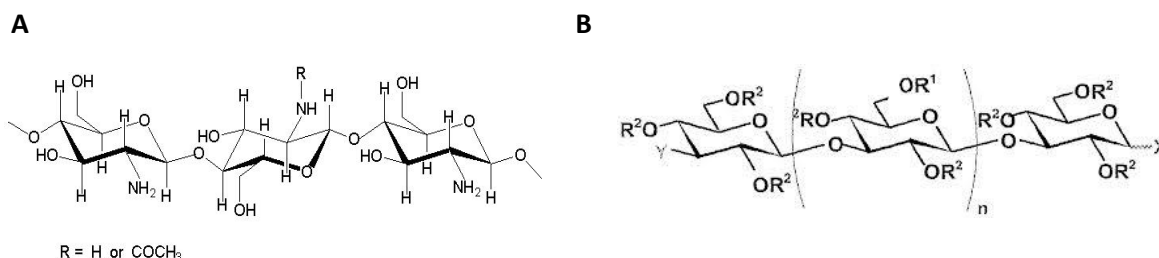


Figura 9. Estructura molecular de los polisacáridos CS (A) y ESS (B).

Varios estudios han demostrado la efectividad del CS a la hora de sintetizar NPs biocompatibles, biodegradables y resistentes a ciertas enzimas. Las NPs de CS son excelentes transportadores de compuestos terapéuticos como la quercetina, el clorhidrato de venlafaxina y los oligonucleótidos.⁷⁹ En medio ácido, esta macromolécula adquiere carga positiva lo que permite unirse a células cargadas negativamente, como las células cancerígenas. Se ha demostrado que la conjugación de selenito o el grupo $-SeO_3$ a la molécula de CS promueve la muerte celular de células de leucemia y sarcoma humanas.⁸⁰ Estudios recientes revelan que la encapsulación de algunos compuestos de Se (selenito y ácido metilselenico (MSeA)) en NPs de CS, aumentan la retención de Se por parte de las células, y como consecuencia mejoran su actividad antioxidante, y disminuyen la respuesta al daño celular respecto a los compuestos de Se libres.⁸¹

II.3.3. Efectos Biológicos de las Nanopartículas de Selenio

Citotoxicidad

Como ya se ha comentado anteriormente, las funciones biológicas del Se dependen directamente de la forma química en la que se encuentre este elemento. Los compuestos de Se orgánicos e inorgánicos pueden presentar diferentes propiedades antioxidantes y prooxidantes, respectivamente. El carácter quimiopreventivo de especies como la SeMet y SeMetSeCys se ha estudiado en numerosas ocasiones,^{49,82-85} sin embargo, no fue hasta hace unos años cuando comenzó a investigar el posible potencial biológico del Se en forma de NPs. Los primeros trabajos, publicados en el año 2001, se centraron en la comparación de la actividad biológica de las NPs de Se con el Se(IV). Se evaluaron aspectos biológicos como la proliferación celular, los niveles de actividad enzimática, y la protección contra los radicales libres de oxígeno involucrados en el daño celular, fueron evaluados en células de hepatocarcinoma humano HepG2 tras su exposición a ambos compuestos. Las NPs mostraron una mayor **protección contra el daño oxidativo**.⁷⁰ Las propiedades de las NPs no han sido únicamente comparadas con la actividad de especies inorgánicas, también se han estudiado especies como la SeMetSeCys y SeMet, consideradas compuestos con propiedades anticancerígenas, para profundizar en los posibles efectos quimiopreventivos de las NPs. En comparación con las especies orgánicas, las NPs de Se poseen la misma capacidad para **augmentar la actividad** de enzimas como la **GPx, Trx y glutatona S-transferasa** presentando una **toxicidad reducida** (evaluada mediante parámetros como la dosis letal media, la toxicidad a corto plazo, y el daño a órganos).^{66,64} A pesar de que la **actividad anticancerígena** de las NPs ha sido propuesta en varios estudios, el mecanismo a través de cual ejercen esta función todavía no está suficientemente claro. Unos autores presentan esta propiedad como resultado de la **inhibición de la proliferación celular, modulación del estado redox, estimulación del sistema inmune, e inhibición de la angiogénesis** (proceso fundamental en el crecimiento tumoral).⁸⁶⁻⁸⁸ Sin embargo, de entre todos los mecanismos propuestos, la **apoptosis celular y la activación de las caspasas** (enzimas críticas para la inducción de apoptosis) han sido los que han recibido más atención por parte de los investigadores.⁸⁹

Además de los prometedores beneficios biológicos de las NPs de Se, estos compuestos se están empezando a considerar prometedores materiales en aplicaciones biomédicas. Generalmente, las interacciones específicas entre ligando-receptor son una de las estrategias más utilizadas a la hora de diseñar sistemas de liberación de fármacos. Siguiendo esta línea, se ha demostrado que las NPs pueden **dirigirse específicamente y acumularse en células**

tumorales y cancerígenas tras conseguir su unión con moléculas diana. Esta conjugación ha sido extensamente empleada en imagen celular y en tratamientos anticancerígenos.⁹⁰ A continuación se comentan brevemente varios estudios en los que las NPs de Se se han combinado con moléculas de diversa naturaleza para distintas finalidades moleculares y biológicas. En el estudio llevado a cabo por Pi y col., se funcionalizaron las NPs de Se con ácido fólico (AF) (AF-NPs de Se) e internalizadas en células de cáncer de mama MCF-7 a través del mecanismo de endocitosis, mediado por un receptor de folato. Las AF-NPs de Se fueron dirigidas a las mitocondrias y transportadas en vesículas endocíticas hacia el núcleo celular, donde bloquearon el ciclo celular. Los resultados obtenidos de este estudio concluyen que las AF-NPs de Se podrían servir como agentes terapéuticos y transportadores de fármacos a órganos específicos en la terapia contra el cáncer.⁹¹ El mecanismo de endocitosis también ayudó a la penetración de las NPs de Se funcionalizadas con 5-fluorouracil (5FU) (5FU-NPs de Se) en células de melanoma humano A375. Uno de los efectos que se observó tras la internalización de este complejo fue la inducción de apoptosis mediada por caspasas.⁹² En otro trabajo, se seleccionó la molécula energética adenosina trifosfato (ATP) para la funcionalización de las NPs (ATP-NPs de Se). Una de las razones de usar este compuesto es que se encuentra en la mayoría de las células eucariotas. El ATP extracelular es un neurotransmisor que puede reconocer específicamente a un receptor de purina presente en varias células cancerígenas.⁹³⁻⁹⁵ De este modo, las ATP-NPs de Se atraviesan la membrana celular fácilmente y por consiguiente se mejora su actividad anticancerígena, como se demostró por la inducción de apoptosis en células de hepatocarcinoma humano HepG2.⁹⁶ Tan y col. demostraron que los conjugados formados entre la molécula orgánica adriamicina (ADM) y las NPs de Se (ADM-NPs de Se) fueron capaces de inhibir la proliferación celular de las células hepáticas tumorales Bel7402 de una manera más eficaz que ambos compuestos por separado.⁹⁷ Los polímeros y polisacáridos, además de jugar un papel importante en la estabilización de las NPs, también han sido empleados en su funcionalización. El polietilenglicol (PEG) es uno de los polímeros biocompatibles más usados en aplicaciones químicas y biológicas.^{98,99} Las NPs de Se modificadas con el polisacárido *Undaria pinnatifida* provocaron la apoptosis, de manera dependiente a la concentración, en diferentes líneas celulares cancerígenas (HepG2, A375, HK-2, etc...)¹⁰⁰ En algunas ocasiones se ha observado que la actividad anticarcinogénica ejercida por las NPs de Se está altamente influenciada por el agente estabilizante empleado en el proceso de síntesis. Los ensayos citotóxicos llevados a cabo en células leucémicas HL-60 concluyeron que en ausencia del estabilizante BSA, las NPs de Se no presentaban la misma actividad biológica que los conjugados BSA-NPs de Se frente a otros compuestos inorgánicos

de Se. La absorción de la proteína sobre la superficie de las NPs fomentó la inhibición del crecimiento de las células tumorales y la desactivación de radicales libres de oxígeno.⁷¹

Ecotoxicidad y Fitotoxicidad

Como se ha comentado al inicio de esta sección, el Se⁰ está muy presente en sedimentos. Este hecho hace que sea necesario incluir a este compuesto de Se como una potencial fuente de exposición a la hora de evaluar los riesgos ecológicos. Además de la presencia natural de Se⁰, los vertidos procedentes de actividades industriales tales como molineras, extracción de carbón y metales, y procesos petroquímicos pueden conllevar a la contaminación en los ecosistemas acuáticos. La mayoría de autores han concluido que las NPs de Se pueden estar disponibles para los organismos acuáticos de manera directa, mediante exposición en el medio acuático o ingestión, o de manera indirecta, tras la oxidación de Se⁰ a Se(IV).¹⁰¹ Todos estos motivos hacen que no sólo sea importante evaluar la toxicidad de las NPs de Se a nivel celular, sino también determinar los riesgos ecológicos relacionados con su presencia en el medio ambiente.

La mayoría de los ensayos focalizados en este sentido se basan en el estudio de la **biodisponibilidad, bioacumulación y toxicidad** presentada por las NPs **en peces e invertebrados**. Sin embargo, en comparación a otras formas de Se (SeMet, Se(VI) y Se(IV)), la información obtenida hasta el momento es escasa. Se ha demostrado que la toxicidad de las NPs de Se puede variar de manera acentuada con respecto a otras especies de Se, por lo que sus efectos biológicos deben ser evaluados en cada caso. Se han evaluado los efectos de las NPs de Se en comparación a los producidos por la especie orgánica SeMet en larvas de mosquito (*Chironomus dilutu*). La exposición a las NPs dio lugar a una mayor inhibición del crecimiento de las larvas.¹⁰¹ De la misma forma, también se han comparado sus efectos en el pez Medaka con los derivados tras la exposición con Se(IV). Con ambas formas de Se se observó un aumento en la concentración de este elemento en diferentes tejidos, sin embargo la capacidad de acumulación de las NPs fue mayor en ciertos órganos, como el hígado, mostrando de esta forma una mayor toxicidad e induciendo al estrés oxidativo.¹⁰²

La acumulación de NPs de Se y sus **efectos biológicos en plantas** apenas se han estudiados. En la mayoría de los estudios, las cuestiones planteadas son: si las plantas son capaces de acumular las NPs, y si las respuestas observadas, en términos de crecimiento y morfogénesis, son diferentes a los efectos producidos por otras especies presentes en el medio ambiente y generalmente empleadas en procesos de biofortificación (Se(VI) y/o Se(IV)).¹⁰³ Golubkina y col. realizaron un estudio comparativo sobre la acumulación de Se en especies de la familia *Allium*

(cebollas, ajos, puerros) tras la aplicación foliar de NPs de Se, Na_2SeO_4 y Na_2SeO_3 . Debido a que los microorganismos presentes en el suelo participan activamente en el metabolismo del Se (unos son capaces de reducir los iones Se^{4+} y Se^{6+} a Se^0 ,¹⁰⁴ mientras que otros se encargan de oxidar de nuevo estas NPs a estados de oxidación más elevados,¹⁰⁵ la aplicación foliar evitó cualquier tipo de alteración en la bioacumulación de las NPs. La baja capacidad de las NPs para transformarse en otras especies orgánicas de Se se reflejó en su baja actividad metabólica y en su significativa absorción por los diferentes componentes de la planta. Los resultados propuestos por estos autores abrieron el camino en los estudios de acumulación y capacidad de migración de las NPs de Se en plantas acumuladoras de Se.¹⁰⁶ En estos trabajos se pone de manifiesto que la captación de las NPs por parte de las plantas esta favorecida por las particularidades que presenta la epidermis de las hojas (tubos, cutícula, tricomas y estigma). Sin embargo, las NPs no solamente pueden penetrar al interior de la planta a través de las hojas, sino mediante microporos.¹⁰⁷ Además, también ha sido planteada la posibilidad de biofortificación de la especie *Heliantus Tuberosus* (tubérculo comestible) con NPs de Se mediante aplicación foliar.¹⁰⁸ Los resultados obtenidos de otros trabajos, en los que se compara el efecto de las NPs de Se con el Se(VI) tras ser adicionados al medio de cultivo, demostraron que las NPs de Se fueron capaces de aumentar la germinación de las semillas y estimular la organogénesis de varias plantas muy utilizadas en agricultura.^{103,109}

II.4. Nanopartículas de Dióxido de Titanio

Los minerales más importantes de titanio (Ti), son rutilo, brookita, anatasa (las tres en forma de TiO_2), ilmenita (FeTiO_3) y titanita (CaTiSiO_5). Depósitos naturales de este metal se encuentran por todo el mundo (Australia, Canada, África, Norte América, Noruega...). Prueba de esto es su elevada producción mundial: 90000 toneladas/año para el Ti metálico, y 4.3 millones toneladas/año para el dióxido de titanio (TiO_2).

En la naturaleza, el Ti se encuentra mayoritariamente en la corteza terrestre (aproximadamente 4400 ppm, el Ti es el noveno elemento más abundante), seguido de suelos (en un intervalo entre 0.02-2.40%), agua de mar (aprox. 1 ppb) y por último en la atmosfera a nivel de trazas. Existen 5 isotopos estables de Ti presentes en la naturaleza (^{48}Ti 74%, ^{46}Ti 8%, ^{47}Ti 7.5%, ^{49}Ti 5.5%, ^{50}Ti 5%), ninguno de ellos es radiactivo.¹¹⁰

El **Ti metálico** es un compuesto sólido que puede encontrarse en cuatro grados (definidos según su contenido en oxígeno): grado 1, 0.18%; grado 2, 0.25%; grado 3, 0.35%; y grado 4, 0.40%. Presenta una baja conductividad eléctrica y térmica, además de una baja elasticidad.

Esta propiedad hace que se convierta en un material frágil cuando es expuesto a hidrogeno en estado gaseoso. A pesar de esto, su uso está incrementándose por sus múltiples beneficios: mantenimiento de sus propiedades a altas temperaturas, una excelente relación fuerza/masa (lo que lo convierte en el metal preferido para turbinas de gas), y su alta tendencia a unirse a otros metales. Una de las características más importantes que presenta el Ti metálico es su resistencia a las condiciones más extremas gracias a la capa impermeable de TiO_2 que se forma sobre su superficie. Esta capa protectora puede resistir a la mayoría de los ataques químicos, e incluso cuando se daña posee la capacidad de regenerarse. La capa de TiO_2 le confiere resistencia a la acción corrosiva del agua del mar por lo que es muy utilizado en la fabricación de submarinos, plataformas petrolíferas, y en las hélices y otras partes de los barcos. El Ti metálico es un material ideal para aplicaciones de transferencia de calor, en las que el refrigerante sea el agua de mar o aguas residuales. También se utiliza en la construcción de edificios (Museo Guggenheim en Bilbao ó en la estación de tren de Hong Kong) y en plantas de producción química, donde el empleo de ácidos corrosivos es frecuente. Los electrodos de Ti recubiertos con metales preciosos son usados en la producción de cloro, en procesos de galvanización y aplicaciones similares.¹¹⁰

El Ti también se puede encontrar **en forma de óxido: TiO , Ti_2O_3** , siendo el TiO_2 el compuesto más estable. . La industria del TiO_2 comenzó en los años 30, cuando los fabricantes de pinturas decidieron buscar un sustituyente para el plomo blanco (considerado venenoso). Éstos encontraron que el TiO_2 presentaba excelentes propiedades para recubrimiento, no era tóxico, y tenía altos índices de refracción, lo que le confiere un color blanco brillante, característico de algunos instrumentos domésticos (neveras, lavadoras).¹¹⁰ La Figura 10 muestra una división de los diferentes sectores en los que se utiliza el TiO_2



Figura 10. Más de la mitad de la producción mundial de TiO_2 es destinada a pinturas, un cuarto a plásticos y el resto a papeles, fibras, cerámicas, colorantes alimenticios, esmaltes, etc...

El TiO_2 puede encontrarse en tres formas cristalinas diferentes: **anatasa, rutilo y brookita**. El tamaño y forma de las partículas de TiO_2 influyen en sus propiedades funcionales, área superficial específica, número de defectos superficiales, temperatura a la cual se produce la transición de fases y estabilidad de las diferentes fases.¹¹¹ Además sus propiedades ópticas y catalíticas también dependen de la fase cristalina, tamaño y porosidad.¹¹² Cuando los cristales de TiO_2 presentan un tamaño inferior a 10 nm, se encuentran generalmente en forma anatasa, mientras que los cristales de mayor tamaño pueden encontrarse en las formas anatasa, rutilo, o como mezcla de ambos.¹¹³ La forma anatasa presenta una actividad fotocatalítica mayor que las otras fases de TiO_2 .¹¹⁴ Termodinámicamente es más estable que el rutilo a tamaños menores de 14 nm.^{115,116}

Además del Ti metálico y los diferentes óxidos de Ti, existen otros compuestos comerciales como el **carburo de Ti (TiC)**. Éste es el material metálico más fuerte después del tungsteno de carbono. El alto contenido en oxígeno lo hace relativamente frágil por lo que se suele utilizar con otros carbonos, de tungsteno, tantalio y niobio.¹¹⁰

II.4.1. Aplicaciones de las Nanopartículas de Dióxido de Titanio

El TiO_2 a escala nanométrica ha captado la atención de la comunidad científica debido a su presencia en un amplio rango de aplicaciones, incluyendo: fotocatalisis (biosensores y placas solares),¹¹⁷⁻¹²⁰ microelectrónica, ingeniería química, sistemas ópticos, producción de colorantes, materiales cerámicos, cosméticos, sensores, síntesis de películas de recubrimiento mesoporosas, catálisis en procesos de descontaminación medioambiental y en medicina.¹²¹

Las micropartículas de TiO_2 reflejan la luz visible y UV, sin embargo, a escala nanométrica, el TiO_2 posee la capacidad de dejar pasar la luz visible y bloquear o reflejar la radiación UV. Esta propiedad las convierte en un componente esencial de las cremas solares.¹²² En la actualidad, la mayoría de los protectores solares contienen agentes bloqueantes (como TiO_2 y ZnO) que o bien reflejan la radiación UV, o atrapan los fotones procedentes de la radiación en su estructura cristalina. Con el objetivo de disminuir la opacidad de estas cremas, los fabricantes han ido disminuyendo el tamaño de las partículas hasta la escala nanométrica. Debido a su mayor fotoactividad, la anatasa tiende a la formación de radicales libres. Este es el motivo principal por el cual se prefiere utilizar rutilo en las formulaciones de las cremas solares.¹²³ Con el objetivo de evitar la formación de especies reactivas de oxígeno tras la irradiación UV, algunos fabricantes han recubierto las NPs de TiO_2 con materiales no semiconductores como silica o zirconio, otros con materiales hidrofóbicos.¹²² La introducción

de estas NPs en productos de consumo ha llevado al planteamiento de algunas cuestiones relacionadas con la salud humana, como la capacidad de penetración de las NPs a través de la piel.^{124,125} En 2006, la Administración de comida y medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*) recibió una petición por parte de los consumidores respecto al uso de nanomateriales en ciertos productos de consumo humano, incluidas las cremas de protección solar: los fabricantes debían informar de la presencia de NPs en sus productos. Como consecuencia de esto, la FDA implantó una normativa respecto a la cantidad permitida de NPs de TiO₂.¹²⁶ El límite establecido es el 25% en peso, cantidad segura y eficaz para la protección. Sin embargo, respecto al tamaño de partícula no existe ninguna normativa.

II.4.2. Reactividad de las Nanopartículas de Dióxido de Titanio: Métodos de Síntesis y Estabilización de las Dispersiones

El grado de agregación de las NPs de TiO₂ depende de muchos factores, y está directamente controlado por las condiciones empleadas en el proceso de síntesis. Variando la temperatura, el tiempo de síntesis y el pH del medio se pueden obtener NPs de distinto tamaño y composición de fases.¹²⁷

El **método sol-gel** ha ganado importancia desde el punto de vista del desarrollo de la nanotecnología ya que permite la síntesis de partículas de TiO₂ con propiedades y estructuras determinadas. En un típico proceso basado en sol-gel, una suspensión coloidal, llamada sol, se forma a partir de reacciones de hidrólisis y polimerización de precursores, que suelen ser sales metálicas inorgánicas o compuestos orgánicos metálicos como alcalóxidos.¹²⁸

Los **alcalóxidos de titanio o el tetracloruro de titanio (TiCl₄)** suelen ser usados como precursores en este método. En este tipo de síntesis se suelen utilizar disolventes orgánicos y altas temperaturas. El resultado son dispersiones coloidales de diferente tamaño y estabilidad. El disolvente orgánico es el encargado de regular el tamaño de partícula.¹²⁹ Chen y col. demostraron que el complejo formado entre la acetilacetona y el tetraisopropóxido de titanio (Ti(OPrⁱ)₄) favoreció la dispersión de las partículas y a una disminución de su tamaño, en comparación con otros disolventes orgánicos como el tolueno o hexano (Figura 11).¹³⁰

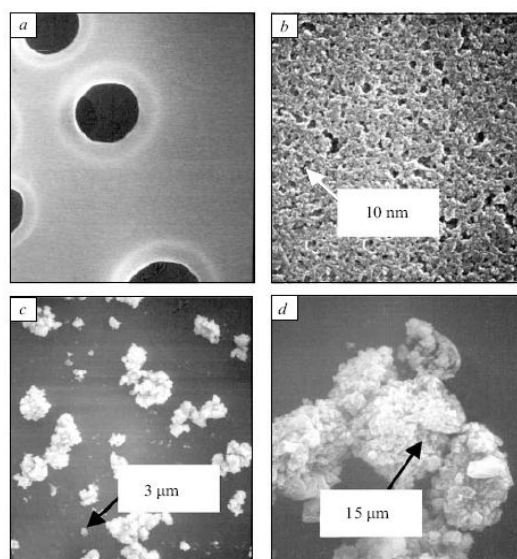


Figura 11. Imágenes SEM de las NPs de TiO_2 sintetizadas a partir de la reacción entre el $\text{Ti}(\text{OPr}^i)_4$ y la acetilacetona, y en presencia de diferentes disolventes orgánicos: acetona (a), butanol (b), tolueno (c) y hexano (d).

El efecto de la temperatura tiene una influencia directa sobre la estructura final de las NPs. Empleando $\text{Ti}(\text{OPr}^i)_4$, las temperaturas bajas facilitaron la formación de NPs en fase anatasa entre 10 y 20 nm.¹³¹ NPs de TiO_2 mesoporosas fueron preparadas mediante la hidrólisis de $\text{Ti}(\text{OPr}^i)_4$ en etanol:agua asistida por ultrasonidos. Tras el secado de los productos de hidrólisis, los datos de XRD indicaron la presencia de partículas en diferentes fases (anatasa, brookita, mezcla anatasa/brookita y partículas amorfas). El incremento de la temperatura de calcinación provocó cambios en la composición de fases de los productos.¹³² En este tipo de síntesis, el pH también ejerce una influencia directa sobre la morfología de las NPs. En este sentido, las NPs preparadas a partir de $\text{Ti}(\text{OPr}^i)_4$ en condiciones ácidas fueron las únicas que adquirieron forma esférica.¹³³ La síntesis de NPs de TiO_2 a partir de $\text{Ti}(\text{OPr}^i)_4$ también ha sido llevada a cabo en presencia del péptido poli-L-lisina (PLL). En este caso el péptido no sirvió solo como agente dispersante sino para definir la estructura final de las NPs, en forma tubular (Figura 12).¹³⁴ Materiales basados en NPs de TiO_2 con estructura tubular son aplicados con éxito en medicina, biotecnología, microelectrónica, óptica, etc...

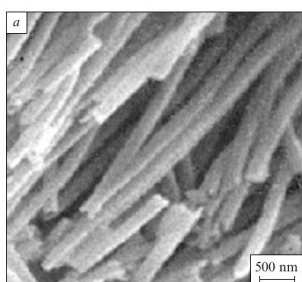


Figura 12. Imágenes SEM de NPs de TiO_2 con estructura tubular sintetizadas a partir de poli-L-lisina

TiO₂ NPs de diferentes formas (esférica, cúbicas, y barras hexagonales) y tamaños (50-500 nm) fueron preparadas a partir de tetrabutoxido de titanio Ti(OBuⁿ)₄ como agente precursor.¹³⁵ La naturaleza del ácido empleado (HCl, HNO₃, H₂SO₄, H₃PO₄), concentración y el tiempo de hidrólisis, tuvieron una gran influencia sobre la fase cristalina, morfología y tamaño de dichas partículas.¹³⁶ El TiCl₄ es otro de los precursores más utilizados.^{137,138} NPs de TiO₂ fueron sintetizadas mediante hidrólisis de TiCl₄ en medio ácido en presencia/ausencia de poli(etilenglicol) (PEG-1000), utilizado como estabilizante para controlar la forma y tamaño de las NPs. En presencia de PEG-1000 la distribución de tamaños fue muy estrecha.¹³⁹

Además de los alcalóxidos de Ti y TiCl₄ mencionados anteriormente, existe otro agente precursor empleado generalmente en la síntesis de nanocristales de anatasa, llamado **dihidroxo-bis(lactato de amonio) de titanio (IV)**.¹⁴⁰ Este compuesto comenzó a utilizarse en la síntesis de NPs de TiO₂ que posteriormente se aplicaban en la fabricación de electrodos utilizados en medicina¹⁴¹ y producción de películas protectoras a la radiación UV.¹⁴² Este compuesto presenta la peculiaridad de hidrolizarse más lentamente que los alcalóxidos, lo que hace posible la síntesis de NPs con una distribución de tamaños más estrecha, y de forma achatada, especialmente importante para la fabricación de películas de TiO₂.

A pesar de la eficacia del método sol-gel, la gran tendencia que presentan las NPs sintetizadas a formar agregados durante la etapa de síntesis y almacenado supone un grave problema, ya que en la mayoría de ocasiones, la agregación viene acompañada de variaciones en la composición de las fases. En principio los agentes estabilizantes ejercen su función mediante diferentes mecanismos: formación de complejos NP inorgánica-recubrimiento superficial orgánico (estabilización estérica),^{129,130} ó como resultado de un balance entre fuerzas repulsivas y atractivas dando lugar a una disminución en la velocidad de sedimentación (estabilización electrostática).¹⁴³ En la **estabilización electrostática** (basada en la teoría de DLVO, que combina la fuerza de van der Waals y la repulsión electrostática), el potencial zeta de las partículas juega un papel importante. En la práctica, si el potencial es mayor a 30mV o menor que -30 mV la dispersión es estable. Este potencial depende en gran medida del pH y de la concentración de electrolitos en la dispersión.¹⁴⁴

A pH y concentración de sales fisiológicas, el potencial zeta no es suficiente para estabilizar las dispersiones. Por lo tanto, entra en juego la **estabilización estérica**, en la que un agente estabilizador es adicionado a la dispersión. Este estabilizante se une a la superficie de la NP y de esta forma se previene la interacción entre NPs. Es importante estudiar la relación concentración estabilizante/NPs ya que podría darse el caso en el que la cantidad de

estabilizante en el medio no sea suficiente para recubrir las NPs y su efecto sea despreciable.¹⁴⁵ Generalmente, los agentes estabilizantes son de naturaleza orgánica como: acetilacetona, dietanolamina, ácido poliacrílico, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, poli(etilenglicol), etc...¹⁴⁶ Dentro de los mecanismos basados en el recubrimiento de las NPs, los ácidos carboxílicos son muy utilizados. Estas moléculas actúan como ligandos específicos debido a su elevada capacidad para modificar de la superficie de las NPs.¹⁴⁷ Dentro de los **ácidos carboxílicos**, el ácido cítrico se usa frecuentemente en la síntesis de NPs de distinta naturaleza química, ejerciendo un control sobre el tamaño de éstas como sobre su morfología. Éste compuesto está muy presente en la naturaleza y puede encontrarse en varias formas (H_3Cit , H_2Cit^- , HCit_2^- y Cit_3^-) dependiendo del pH del medio. En el estudio llevado a cabo por Imali y su grupo de investigación, se demostró que el ácido cítrico podía modificar el comportamiento de agregación de las NPs de TiO_2 alterando su carga superficial. La adsorción de ácido cítrico sobre la superficie de las NPs (en fase anatasa) dependía fuertemente del pH (en el intervalo de 2.0 a 7.5), disminuyendo el recubrimiento a medida que se alcanzaban valores de pH más elevados. La adsorción era irreversible, lo que indicó la existencia de una fuerte coordinación entre las moléculas de ácido y la superficie de las NPs.¹⁴⁸

Se conoce que las NPs en **soluciones fisiológicas** tienden a aglomerarse y muestran diferentes efectos biológicos con respecto a las NPs dispersas.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ A la hora de investigar los efectos de las NPs de TiO_2 in vitro, no sólo es necesaria la selección de una metodología de ultrasonidos adecuada, sino la optimización de agentes dispersivos efectivos para evitar la agregación de NPs en los medios de cultivo. En este sentido, varios estabilizantes como **albumina de suero humano (HSA)**, **de suero bovino (BSA)**, **de suero de ratón (MSA)**, **el surfactante Tween 80**, han sido adicionados.¹⁴⁵

La agregación de NPs es también un factor importante a la hora de evaluar su transporte y destino en el **medio ambiente**. Un estabilizante muy utilizado en estudios con fines medio ambientales y ecotoxicológicos son las sustancia húmicas. Los **ácidos fúlvicos**, cuya presencia es muy abundante en sistemas acuáticos, juegan un papel crítico en los mecanismos de agregación de las NPs de TiO_2 . Estos ácidos modifican significativamente las propiedades superficiales de las NPs (carga eléctrica y naturaleza química de los sitios activos de superficie) y su tamaño.¹⁵²

Existen una gran variedad de **aminas** con interesantes propiedades biológicas y químicas que se pueden unir a la superficie de las **NPs de TiO_2** dando lugar a NPs **con diferente funcionalidad**. Sin embargo la afinidad entre el grupo amino y las NPs puede verse alterada

por el medio acuoso o la presencia de agentes surfactantes utilizados en el medio de síntesis.^{153,154} Por ejemplo, la reacción entre el polímero poli(1,4-butanodiol) y el TiCl_4 dio lugar a la formación de nanocristales coloidales con una capa de polímero y varios sitios ácidos. Esta química favoreció la capacidad para reaccionar con las moléculas de polianilina. Este material mostró interesantes propiedades ópticas.¹⁵⁵ Las NPs de TiO_2 también presentan una elevada afinidad por **compuestos orgánicos aromáticos**, como la alizarina roja S (ARS, *alizarin red S*). Este derivado de la antraquinona es capaz de modificar la superficie de las NPs y formar conjugados ARS-NPs de TiO_2 que presentan una banda de absorción característica en el espectro UV (entre 400 y 550 nm). La síntesis de estos nano-conjugados resultó de gran utilidad para demostrar que las NPs de TiO_2 eran capaces de penetrar en células vegetales y acumularse en diferentes orgánulos sub-celulares.¹⁵⁶

II.4.3. Efectos Biológicos de las Nanopartículas de Dióxido de Titanio

Citotoxicidad

Como en la mayoría de los estudios realizados *in vitro* e *in vivo*, se ha observado que la respuesta celular se encuentra afectada de una manera dependiente a la concentración de las NPs de TiO_2 y tiempo de exposición empleados en un determinado ensayo. Las NPs de TiO_2 son capaces de penetrar en el interior celular y desencadenar diferentes respuestas celulares como: producción de ROS, modificaciones de microfilamentos y microtubulos presentes en el citoesqueleto, e incluso inducir a la apoptosis.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Los resultados obtenidos por varios autores han concluido que los efectos toxicológicos de las NPs de TiO_2 en cualquier línea celular pueden simplificarse en 6 eventos, recogidos en la Figura 13.

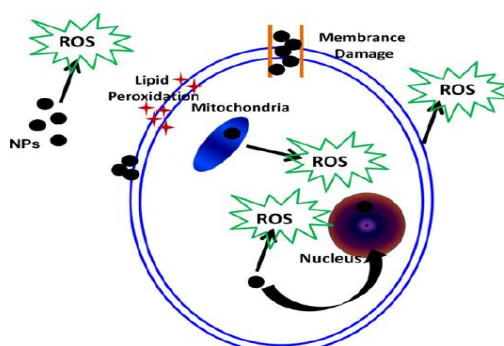


Figura 13. En primer lugar, la formación de ROS podría ser el factor clave que desencadene los sucesivos mecanismos. Estas especies afectan a la integridad de la membrana plasmática mediante peroxidación lipídica, permitiendo la penetración de las NPs. La localización de las NPs de TiO_2 en el interior celular puede alterar diversas

funciones, ya que unidades subcelulares como lisosomas, retículo endoplasmático, y núcleo se encuentran afectadas. Es importante resaltar, que el daño celular resultante de cualquiera de estos mecanismos implicados puede conllevar a la apoptosis o interferir en cualquiera de los procesos celulares provocando la muerte celular.⁴⁸

En el caso de este tipo de NPs, la interacción NPs-células puede resultar más difícil de evaluar y entender debido a la influencia de sus propiedades superficiales. Además de la concentración, tamaño de NPs y tiempo de exposición, dependiendo de la fase cristalina en la que se encuentren (anatasa, rutilo o combinación de ambas), las NPs de TiO₂ pueden llegar a mostrar diferentes efectos tóxicos. En este sentido, muchos autores han llevado a cabo estudios en los que el objetivo principal ha sido evaluar la influencia de la estructura de las NPs sobre determinadas respuestas biológicas. La fase estructural en la cual se encuentren las NPs está directamente relacionada con su reactividad química. Las propiedades fotocatalíticas de varios tipos de NPs de TiO₂ (anatasa, rutilo y combinación de ambas) fueron estudiadas sobre diferentes índices de citotoxicidad en fibroblastos de piel humanos y células epiteliales de pulmón. Las **NPs en fase anatasa** (consideradas más fotoactivas) mostraron una **mayor citotoxicidad** y unos índices de inflamación más elevados que el resto de NPs. En concreto, este estudio demostró que bajo las mismas condiciones experimentales, las NPs en fase anatasa fueron 100 veces más tóxicas que las NPs en fase rutilo.⁴⁶

Allouni y col., también evaluaron el grado de captación de las NPs por parte de las células de fibroblastos, no solamente en función de la dosis suministrada, sino en función de sus propiedades físico-químicas. Se observó que los aglomerados de NPs se encontraban tanto adheridos a la membrana plasmática como en el interior de las células (citoplasma y dentro de vesículas citoplasmáticas). En esta investigación se recogió una visión general de **cómo afecta la dosis, tamaño y estructura de las NPs al grado de interacción con las células**. Como era de esperar, la asociación de las NPs a las células, y por consiguiente sus efectos biológicos, fueron más acentuados a medida que la **dosis aumentaba** y el **tamaño de NPs era menor** (mayor acumulación de NPs en fase anatasa de 5 nm, seguido de 10 nm y 40 nm). Sin embargo, la variable que marcó de forma acentuada el grado de asociación fue la estructura. La mayor asociación se observó para las **NPs esféricas compuestas por las fases anatasa y rutilo**, y la menor para las NPs en fase rutilo con forma de aguja. Los grandes aglomerados de NPs con estructura anatasa/rutilo desencadenaron una serie de procesos entre los que se encuentra involucrada la **modificación de los filamentos de actina** (esenciales para funciones celulares tan importantes como la movilidad y la contracción de la célula durante la división celular).¹⁶⁰

Siguiendo los resultados obtenidos en este estudio, muchos autores han demostrado que las **NPs de TiO₂ en la forma cristalina anatasa son biológicamente más activas que en fase rutilo**, en términos de citotoxicidad.^{161,46} Por el contrario, otros autores han concluido que las **NPs con estructura anatasa/rutilo** poseen una mayor capacidad para **inducir a la citotoxicidad, estrés oxidativo y daño al ADN** celular en las células intestinales humanas Caco-2, en comparación a las NPs.⁴⁵ Por lo tanto, se puede concluir que son necesarios más conocimientos que nos permitan profundizar en la interacción y mecanismos del daño celular inducido por las NPs de TiO₂.

Otra cuestión importante a la hora de establecer los efectos de las NPs es la validación de los ensayos llevados a cabo in vitro mediante experimentos in vivo. Al igual que en los ensayos realizados en diferentes líneas celulares, los experimentos llevados a cabo en ratones tras el suministro oral de NPs y MPs de TiO₂ mostraron que las partículas a escala nanométrica fueron las más tóxicas debido a la capacidad de entrar más rápidamente en el epitelio celular y dirigirse a un espacio subepitelial.¹⁶² Por otro lado, Han y col. corroboraron que todas las variables afectadas tras la instilación intratraqueal de NPs a ratas estaban directa o indirectamente relacionadas con el estrés oxidativo, principal efecto observado tras el tratamiento de células epiteliales alveolares.¹⁶³ Sin embargo, los estudios realizados in vivo siguen siendo escasos, por lo que los mecanismos involucrados en la genotoxicidad de las NPs de TiO₂ no han sido completamente elucidados.

Dentro de los estudios enfocados a elucidar los riesgos derivados de la exposición a las NPs de TiO₂, es importante hacer una mención especial a las investigaciones realizadas sobre los posibles **efectos de las NPs introducidas en productos cosméticos y cremas solares**. Cuestiones sobre la acumulación de las NPs, penetración de éstas a través de la piel y su consiguiente transporte a diferentes compartimentos celulares, son planteadas con frecuencia. Hasta el momento, todos los resultados a los que se ha tenido acceso, incluyendo estudios realizados en humanos, demuestran que las **NPs de TiO₂ presentes en las cremas solares no son capaces de atravesar la piel**, incluso en aquellos casos en los que la piel se encuentra dañada.¹⁶⁴⁻¹⁶⁷ Estos resultados han sido confirmados por investigaciones exhaustivas realizadas en 7 universidades Europeas, dentro del proyecto *EU Nanodrem*, en las que se han empleado las técnicas más actuales y adecuadas para evaluar el grado de penetración de las NPs de TiO₂. El estudio realizado por Sadrieh y col. utilizando diferentes tipos de NPs de TiO₂ (en el rango de los nanómetros a los micrómetros, y recubiertas por el copolímero dimeticona/meticona (silicona muy utilizada en la industria de la cosmética) mostró un elevado contenido de Ti en diferentes secciones de la piel animal, pero una insignificante

penetración de NPs a capas más profundas de la epidermis.¹²² En otro estudio se evaluó la penetración de NPs de TiO₂ de distinta naturaleza química (hidrofílicas, hidrofóbicas (recubiertas con trimetiloctilsilano), y anfólicas (recubiertas con Al₂O₃ y SiO₂)). En ningún caso se encontró penetración, todas las partículas se localizaron en la superficie.¹⁶⁸ Bennat y Müller-Goymann sugirieron que los folículos capilares podrían actuar como ruta de penetración hacia las primeras capas de la epidermis, y que el medio en el que se encuentran suspendidas las NPs (aceite ó emulsión aceite/agua) también afectaba directamente a su capacidad de penetración.¹⁶⁹ El papel de los folículos capilares en la penetración de las NPs también ha sido comentado en otros estudios.¹⁷⁰

Ecotoxicidad y Fitotoxicidad

Datos de **ecotoxicidad** sobre el efecto de las NPs son siempre necesarios para comprender los riesgos medio ambientales asociados a su presencia. En especial para el caso de las NPs de TiO₂, ya que el pequeño tamaño de éstas, su elevada movilidad y su alta reactividad fomentan la capacidad para liberarse en el medio ambiente. Para entender el comportamiento, transporte y destino de las NPs de TiO₂ en sistemas acuáticos es esencial conocer sus interacciones con los diferentes componentes presentes en las aguas naturales y su comportamiento bajo un amplio rango de condiciones físico-químicas.¹⁵² Diferentes tests ecotoxicológicos han sido llevados a cabo para evaluar el impacto de las NPs sobre los ecosistemas acuáticos y terrestres.¹⁷¹

Los ensayos llevados a cabo en el crustáceo *Porcellio scaber* (cochinilla de humedad) proporcionaron datos sobre actividad enzimática, asimilación, crecimiento y mortalidad de la especie. Las enzimas investigadas (catalasa (CAT) y glutatona-S-transferasa (GST)), estaban directamente involucradas en la defensa antioxidante contra la formación de ROS. En este trabajo, el tiempo de exposición fue la variable que marcó notablemente la diferencia entre los efectos observados tras el tratamiento con las NPs. La asimilación de NPs se vio favorecida por tiempos largos, incluso para concentraciones bajas. Este hecho se tradujo en un mayor potencial de sus efectos adversos a largo plazo. Este estudio sirve de ejemplo para justificar la importancia de desarrollar estudios que nos permitan conocer tanto los efectos desencadenados a largo plazo tras la exposición de las NPs, como las dinámicas que controlan el crecimiento de las poblaciones.¹⁷² La capacidad fotocatalítica de las NPs de TiO₂ para producir ROS también debe ser considerada a la hora de evaluar sus riesgos medio ambientales.¹⁷²⁻¹⁷⁵ Un aumento de la producción de ROS y de sus consiguientes efectos tóxicos fue observado en

varias especies de fitoplacton tras su exposición a NPs de TiO_2 y bajo el estímulo de la radiación UV. Estos datos fueron relevantes desde el punto de vista ecotoxicológico ya que mostraron una disminución de la resistencia de los ecosistemas marinos.¹⁷⁶ Los efectos tóxicos observados tras la exposición de la especie *Daphnia magna* (pulgas de agua) a una dieta diaria basada en algas contaminadas con NPs de TiO_2 , demostraron la capacidad de acumulación de las NPs en el tracto digestivo y la diferente biodisponibilidad de las NPs en función del tiempo que estaban presentes en el medio ambiente.¹⁷⁷

La mayoría de los **estudios en plantas** han demostrado que las NPs de TiO_2 son capaces de acumularse en diferentes tejidos vegetales. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, las NPs penetraron en las células vegetales y se acumularon en orgánulos subcelulares específicos.¹⁵⁶ En la planta de maíz se acumularon en las células de la epidermis de las raíces, pero no se detectaron en el sistema vascular, a través del cual suelen ser transportadas.¹⁷⁸ En la planta de trigo se observó que únicamente las NPs de menor tamaño (en el intervalo de 14 a 655 nm) fueron capaces de acumularse en las raíces y distribuirse a través de los tejidos de la planta sin disolución o modificación de su fase cristalina. Los resultados mostraron un impacto moderado de las NPs en la biomasa y actividad fotosintética de las plantas.¹⁷⁹ Como se ha comentado anteriormente, además de evaluar la acumulación y los mecanismos de transporte, es importante profundizar en los procesos de biotransformación. En el caso de las NPs de TiO_2 , no se han encontrado evidencias de que éstas puedan ser transformadas a otros compuestos.¹⁸⁰

II.5. Metodologías Analíticas Empleadas en el Análisis Cualitativo y Cuantitativo de las Nanopartículas Inorgánicas

II.5.1. Análisis Cualitativo: Caracterización y Detección de NPs

La nanotecnología ha sufrido un rápido crecimiento en la industria, y a pesar de que cada vez son más numerosos los productos que contienen NPs, los conocimientos adquiridos sobre la incidencia, destino y toxicidad de las mismas son escasos. Esta falta de información es generalmente debida a la limitada disponibilidad de métodos analíticos adecuados para la detección y caracterización de NPs. Las metodologías y técnicas analíticas empleadas deben ser robustas y capaces de proporcionar, por un lado una descripción detallada de las NPs (en términos de tamaño, morfología, y estructura química) y por otro lado, una información analítica completa (en términos de composición elemental y concentración).

A continuación se ofrece una visión general de las diferentes técnicas disponibles para la caracterización, detección y cuantificación de NPs inorgánicas en diferentes matrices. Entre ellas cabe destacar: la microscopía, espectroscopia, técnicas de separación como la centrifugación y filtración, cromatografía, y otras técnicas relacionadas.

Microscopía Electrónica

Los métodos microscópicos son los más demandados para determinar el estado de agregación, dispersión, tamaño, estructura y forma de las NPs. Las técnicas de microscopía electrónica más utilizadas son la **microscopía electrónica de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscopy*)** y de **transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*)**.

En SEM los electrones son dispersados y detectados en la superficie de la muestra proporcionando una visión superficial de la morfología de las NPs, mientras que en TEM los electrones son transmitidos a través de un espécimen (muestra) (por lo tanto el espécimen tiene que ser muy fino para obtener la imagen) haciendo posible el análisis de NPs localizadas en su interior.¹⁸¹

Entre las ventajas que ofrece la microscopía electrónica se encuentra la posibilidad de poder acoplarse a técnicas analíticas (mayoritariamente espectroscópicas) para proporcionar información de la composición elemental, conocido como **microscopía electrónica analítica (AEM, *Analytical Electron Microscopy*)**. En este sentido, la **espectroscopia de rayos X (EDS, *Energy Dispersive Spectroscopy*)** puede combinarse con SEM y TEM ya que permite una clara identificación de elementos más pesados que el oxígeno, con un 20% de error. Otras técnicas empleadas en el análisis elemental son la **espectroscopia de pérdida de energía electrónica (EELS, *electron energy-loss spectroscopy*)** y la **difracción electrónica en área seleccionada (SAED, *selected-area electron diffraction*)**. La primera proporciona un error cuantitativo menor que EDS (aproximadamente el 10%), mientras que la segunda proporciona información de la estructura cristalina de las partículas.¹⁸²

Con el objetivo de monitorizar NPs y coloides en sus condiciones más naturales, como por ejemplo en medios acuáticos, se ha desarrollado la técnica de **microscopía electrónica de barrido medio ambiental (ESEM, *Environmental Scanning Electron Microscopy*)**. Sin embargo, la ventaja de poder analizar las muestras en su estado natural se puede convertir en un inconveniente ya que la interpretación de los datos puede resultar más compleja. Muchos autores proponen esta técnica como herramienta complementaria a otros métodos.^{35,183}

Dentro de las técnicas microscópicas se encuentra la **microscopía con láser confocal (CLM, Confocal Laser Microscopy) (electrónica y de barrido)**. Mediante el uso de CLM de barrido se pueden obtener resoluciones de hasta 200 nm, y una localización precisa de objetos fluorescentes muy finos. Sin embargo, en este tipo de microscopía la difracción de la luz es el factor limitante. La CLM ha sido aplicada para la caracterización de coloides y además, se ha combinado con la **espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS, Fluorescent Correlation Spectroscopy)** para caracterizar especies fluorescentes en sistemas complejos.¹⁸⁴

A pesar de las ventajas que ofrece la microscopía electrónica, ésta es una técnica destructiva, lo que significa que la muestra no puede ser examinada varias veces o por otro método de validación. Además, la cantidad de muestra analizada es mínima, lo que se traduce en grandes desviaciones en el análisis estadístico de los resultados (el tamaño de partícula medio y su distribución depende directamente del número de partículas medidas). Otra limitación es la que supone la condición de vacío para llevar a cabo los análisis. Esto implica que muestras líquidas no se pueden introducir en los equipos siendo necesarios pasos de deshidratación e inclusión en resinas, y como consecuencia pueden producirse alteraciones en las muestras.³⁵ Estos inconvenientes pueden ser solventados empleando herramientas alternativas como la **microscopía de rayos X (XRM, X-ray Microscopy)**. Ésta técnica puede ser empleada para muestras en estado acuoso sin la necesidad de una preparación previa, obteniéndose una buena resolución espacial (por debajo de los 30 nm).¹⁸⁵ La visualización de NPs bajo condiciones líquidas también es posible con la **microscopía de fuerza iónica (AFM, Atomic Force Microscopy)**. Con esta técnica se pueden obtener perfiles superficiales en 3D con una resolución de aproximadamente de 0.5 nm. A pesar de las ventajas que supone operar bajo condiciones ambiente y poder analizar las NPs en muestras en estado líquido, se plantean algunas cuestiones. La primera es la falta de conocimiento sobre si la visualización bajo humedad o en medios acuosos proporciona mejores resultados que los instrumentos que operan a vacío. En un primer momento, el poder analizar la muestra en su estado natural simula las mejores condiciones experimentales. Sin embargo la humedad atmosférica puede por un lado, conservar las uniones entre coloides y moléculas de agua y por otro lado, las puntas de los instrumentos de AFM pueden recubrirse de materia orgánica, afectando de este modo a la veracidad de las imágenes.³⁵ Por último, la utilización de la técnica **crio-TEM** ofrece la posibilidad de visualizar muestras congeladas preservando de esta forma, las estructuras que pueden perderse o modificarse durante los métodos de preparación. Wang y col. emplearon este método en la identificación de NPs de TiO₂ dopadas con Fe (III).¹⁸⁶

Técnicas Basadas en la Dispersión de la Luz

Las más comunes son **dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic Light Scattering*)** y **láser multi-ángulo de dispersión de luz (MALLS, *multi-angle laser light scattering*)**. Al igual que las técnicas comentadas anteriormente, presentan inconvenientes y ventajas. El inconveniente principal es que el tamaño proporcionado corresponde al diámetro hidrodinámico,¹⁸⁷ en cambio, los espectros de absorción pueden proporcionar información sobre las moléculas adheridas a la superficie de las NPs. En el caso de las NPs de Au, se observó que éstas no sólo estaban recubiertas por las moléculas de citrato usado en la reacción de síntesis, sino también por proteínas y lípidos.¹⁸⁸ Además de proporcionar información directa sobre las características de las NPs, utilizando MALLS también podemos calcular la masa molar sin necesidad de métodos de calibración.¹⁸⁹

Otros métodos basados en la detección láser menos mencionados son **scattering de rayos X de ángulo pequeño (SAXS, *Small-angle X-ray scattering*)**, capaz de caracterizar sistemas mono y polidispersos, y la **detección de ruptura inducida por láser (LIBD, *Laser-induced breakdown detection*)**, técnica prometedora para detectar cantidades de NPs (< 100 nm) en suspensiones acuosas a nivel de trazas.^{190,191}

Métodos Espectroscópicos

Mientras que la **espectroscopia de rayos X** proporciona información cristalográfica, la **resonancia magnética nuclear (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*)** es generalmente usada para elucidar la estructura 3D de las muestras.¹⁸⁵ La **espectroscopia raman** también ha sido utilizada para la caracterización estructural de NPs en algunos trabajos, como por ejemplo en la determinación de CNTs en superficies acuosas.¹⁹²

II.5.2. Análisis Cuantitativo de las Nanopartículas

El análisis de las NPs puede llegar a resultar complejo ya que se encuentra sujeto a diversas problemáticas relacionadas con las condiciones experimentales, y derivadas de los protocolos de extracción empleados, que conllevan en la mayoría de los casos a alteraciones de sus propiedades físico-químicas. Además, a estos inconvenientes se les une la falta de patrones de referencia y materiales certificados a la hora de validar los resultados.

La preparación de dispersiones estables es probablemente uno de los objetivos más importantes tanto en el análisis cualitativo como cuantitativo de las NPs. Los agentes

estabilizantes empleados en el proceso de síntesis o los recubrimientos orgánicos e inorgánicos de las NPs pueden perder su funcionalidad durante la etapa de tratamiento de muestra. Por ejemplo, en el caso en el que las NPs están estabilizadas sólo estéricamente por agentes surfactantes, una dilución podría causar la agregación o disolución de las mismas.¹⁹³ Si la estabilización es dependiente de la carga superficial, un cambio de pH podría modificar de igual forma el estado de agregación. Los disolventes orgánicos y agentes químicos requeridos en las técnicas de separación, por ejemplo en cromatografía, pueden modificar las propiedades primarias de las NPs y su estado de agregación, dando lugar a información errónea sobre la distribución de tamaños.¹⁹⁴

Como en la mayoría de las metodologías llevadas a cabo en los distintos campos analíticos, en el caso de las NPs la preparación de muestra se considera una etapa crítica. En los protocolos de extracción es frecuente el uso de agentes químicos dispersantes (reactivos surfactantes y moléculas orgánicas), o el empleo de la energía de ultrasonidos para facilitar la extracción de NPs de la muestra. Sin embargo, estas alternativas no aseguran que el estado físico-químico de las mismas no pueda ser modificado. Además, la presencia de otras NPs naturales y materia orgánica presentes en las muestras pueden dificultar los procedimientos analíticos. Por ejemplo, la extracción de NPs de suelos y sedimentos puede llegar a complicarse por la presencia de partículas sólidas naturales de tamaño similar al de las NPs estudiadas.¹⁹⁵

Como se ha comentado anteriormente, la disponibilidad de estándares y materiales certificados en el campo de la nanotecnología es limitada. Actualmente hay grupos de trabajo encargados de la estandarización de métodos (por ejemplo caracterización de CNTs usando técnicas de microscopía electrónica, espectroscopia fotoluminiscente infraroja, espectroscopia Raman o de absorción UV-Vis-NIR),¹⁹⁶ y también existen guías y protocolos en los que se detallan las pautas a seguir en el tratamiento de NPs.^{197,198} A pesar de esto, la información existente es escasa y continuamente se plantea la necesidad de estandarizar los métodos de tratamiento y caracterización de las NPs. Actualmente, se encuentran disponibles una amplia variedad de métodos tanto para el análisis de NPs naturales como sintetizadas. La mayoría de estos métodos han sido optimizados en matrices sencillas, por lo que el reto de la química analítica se basa en la extrapolación a matrices más complejas con el fin de obtener la información necesaria en cada caso.¹⁹²

Técnicas de Análisis Elemental

Las diferentes **fuentes de ICP (ICP-MS, ICP-OES)** se consideran excelentes herramientas para el análisis elemental de NPs inorgánicas. Se ha demostrado que ICP-MS presenta una elevada sensibilidad y robustez para cuantificar la composición de metales en una amplia variedad de matrices. ICP-MS ofrece la posibilidad de la introducción directa de las NPs en la fuente de ionización (plasma). Este hecho supone la ventaja de que no es necesario un tratamiento previo de la muestra. Sin embargo, el análisis directo de las NPs metálicas presenta algunos inconvenientes debido a la baja eficiencia de nebulización en casos en los que las NPs se encuentren formando agregados de gran tamaño, proporcionando bajas recuperaciones. Existen informaciones contradictorias sobre las diferencias en la eficiencia de nebulización de las NPs. Mientras que unos autores han concluido que la introducción de las NPs menores de 2 μm a través de nebulizadores tipo slurry tienen un comportamiento similar a los estándares acuosos comúnmente utilizados en ICP,¹⁹⁹ otros han demostrado que esta técnica es sólo capaz de ionizar y atomizar NPs esféricas de tamaño comprendido entre 5 y 25 nm bajo las condiciones de alta temperatura del plasma.²⁰⁰ Debido a esto, es conveniente evaluar en cada ensayo las posibles diferencias en la eficiencia de nebulización.

Otro problema asociado a la introducción directa de las NPs en ICP-MS son las pérdidas por adsorción de las mismas sobre el sistema de introducción de muestra, lo que conlleva a una cuantificación complicada.²⁰¹ En este sentido, es importante llevar a cabo una digestión previa de la muestra, usando una combinación de ácidos a alta temperatura.^{202,203} Las concentraciones de Cd y Se fueron determinadas en la planta *Arabidopsis thaliana*, previamente expuesta a QDs de CdSe/ZnS, empleando una mezcla de HNO_3 y H_2O_2 (4:1) y calor para digerir los tejidos.²⁰⁴ Las diferencias entre la acumulación de NPs de Ag y micropartículas en células endoteliales de cerebro de ratas se evaluaron mediante digestión con HNO_3 de las muestras y posterior análisis ICP-MS. Tras la cuantificación de los contenidos de Ag se demostró que las NPs se acumulan más fácilmente que las micropartículas.²⁰⁵ Digestiones empleando ácidos más fuertes, como H_2SO_4 , o mezcla de ácidos formados por HF, se suelen emplear con el objetivo de descomponer la estructura cristalina de óxidos metálicos, como las NPs de TiO_2 , pero conllevan a un cierto riesgo de pérdida de metal debido a la formación fluoruros altamente volátiles (SiF_4 o TiF_4).¹⁹⁴ Los métodos analíticos basados en digestiones ácidas ofrecen la posibilidad de reducir los efectos de matriz debido a la eliminación de componentes biológicos presentes en la muestra o de agentes estabilizantes empleados para evitar la agregación de las NPs.

Por otra parte, la extracción asistida por ultrasonidos, además de permitir la extracción de las NPs también, favorece su dispersión.²⁰⁶ Utilizando la energía de ultrasonidos se determinó la concentración de Ti en fibroblastos expuestos a NPs de TiO₂.¹⁶⁰ Sin embargo, al igual que en los métodos de digestión, la forma química de las NPs puede verse alterada debido al uso de soluciones ácidas ó básicas como medio extractante, o incluso por la propia energía de ultrasonidos.

Otras técnicas alternativas a las técnicas ICP son la **espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito (GF-AAS, Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy)**,²⁰⁷ y la **vaporización electro térmica (ETV, Electro Thermal Vaporization)**. Esta última puede ser considerada una alternativa como sistema de introducción de muestra, ya que permite la pre-digestión de las NPs.^{208,209}

A pesar de las numerosas ventajas que ofrece ICP-MS y otras técnicas atómicas, no es posible distinguir la naturaleza química del elemento, es decir, si se encuentra en forma de NPs o como ión. Para llevar a cabo esta diferenciación se necesita por un lado el empleo de tratamientos previos como filtración, centrifugación o sedimentación, que permiten separar las NPs de las soluciones, o por otro lado el empleo de técnicas de separación acopladas a ICP-MS.

Métodos de Separación: Filtración y Centrifugación

Actualmente, los métodos de separación de NPs y MPs disponibles ofrecen infinitas posibilidades a la hora de desarrollar metodologías analíticas. Tal y como aparece esquematizado en la Figura 14, dependiendo de la complejidad de la muestra, tamaño y naturaleza química de las NPs, y de la finalidad del análisis requerido, es conveniente seleccionar el método de separación que nos proporcione la información más precisa, empleando el menor tiempo posible y reduciendo costes.

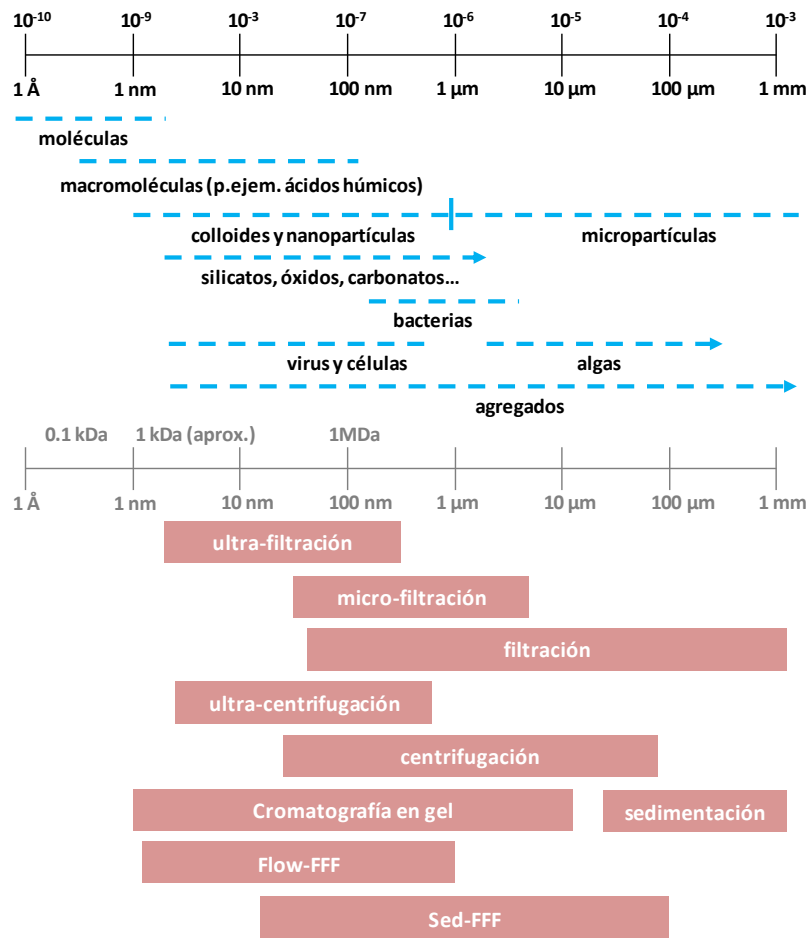


Figura14. Técnicas disponibles para la separación de NPs en solución en función de su tamaño.

La filtración y centrifugación son empleadas para diferenciar entre NPs y especies iónicas. Estas técnicas proporcionan un fraccionamiento por tamaño de las partículas, y destacan por ser baratas, rápidas, sencillas y permitir trabajar con grandes volúmenes de muestra.

Centrifugación

Las centrifugas comunes, encontradas en la mayoría de los laboratorios, pueden separar partículas por debajo de 500 nm, mientras que la ultra-centrifugación por debajo de 1 nm. A pesar de su fácil manejo y su capacidad de separación, el fraccionamiento de tamaños es limitado y la resolución obtenida es relativamente baja.¹⁹⁴ Respecto a la ultra-centrifugación, hay dos tipos: analítica y preparativa. En la analítica, la muestra puede ser monitorizada en tiempo real usando sistemas de detección óptica basados en la absorción de luz ultravioleta y/o sistemas de índices de refracción. Generalmente es usada para la separación de macromoléculas y en casos en los que pueda producirse una sedimentación rápida. Por lo contrario, la preparativa es más adecuada para partículas más pequeñas, para separaciones en

gradiente. En muchas ocasiones suele emplearse antes de los análisis llevados a cabo mediante microscopía electrónica.

Filtración

Se presenta como una metodología adecuada no sólo para distinguir entre iones y NPs, como en el caso de la centrifugación, sino también para obtener información sobre el tamaño de las mismas. Las membranas de filtración tradicionales permiten el fraccionamiento de partículas entre 0.2 y 1 μm .²¹⁰ Las técnicas de ultra- o nano-filtración permiten utilizar filtros con poros de tamaño más pequeños, llegando incluso a filtrar NPs por debajo de 3 a 1 nm. Para la separación de NPs e iones se suelen utilizar filtros con un tamaño de poro entre 0.5 y 1 nm.²⁰⁰ La filtración secuencial ha sido empleada con éxito en la separación de NPs de Ag liberadas de textiles.²¹¹

Las técnicas de filtración convencionales, excepto ultra-filtración, son fáciles de manejar y no muy costosas. Sin embargo son poco precisas, ya que se puede obtener una información errónea sobre el tamaño de las NPs debido a la obstrucción de los poros de la membrana, o a las interacciones electrostáticas entre el material empleado y las NPs.²¹² Entre otras desventajas se encuentran: el riesgo de contaminación, los efectos memoria durante la preparación de muestra, y la posibilidad inexistente de trabajar con volúmenes.¹⁹⁴

Una mayor resolución en la distribución de tamaños puede obtenerse empleando técnicas hífenadas ó single-particle (sp)ICP-MS.

Técnicas Hifenadas

Los métodos de separación cromatográficos como: **exclusión por tamaños (SEC, Size Exclusion Chromatography)**, **cromatografía hidrodinámica (HDC, Hydrodynamic Chromatography)** y **electroforesis capilar (CE, Capillary Electrophoresis)**, permiten la separación de partículas de tamaño entre 10 y 80 nm, y han sido extensamente usados en la separación de NPs tanto orgánicas como inorgánicas.^{213,214} Aunque la aplicación de **SEC** ha dado lugar a resultados satisfactorios en muchos estudios, el material poroso del interior de las columnas puede conllevar a la adsorción inespecífica y causar interacciones indeseadas, lo que hace necesaria la adición de aditivos para bloquear los sitios activos de la fase estacionaria. SEC ha sido combinada con técnicas de detección como voltamperometría, ICP-MS, DLS, y MALLS, para la caracterización de NPs de Au,^{215,216} QDs,²¹⁷ y nanotubos de carbono (SWNTs).²¹⁸ En **HDC** la separación de las NPs se lleva a cabo en base a sus radios hidrodinámicos. A pesar de la baja resolución de este método, la combinación con la detección

UV o de fluorescencia, ha permitido la caracterización de NPs y coloides.²¹⁹ Por último, la **CE**, que separa las partículas en función de su relación masa/carga, ha sido aplicada con éxito para la separación de NPs de poliestireno de diferentes tamaños.^{220,221}

Actualmente, el desarrollo de otras técnicas de separación, como **fraccionamiento de campo de flujo (FFF, Field Flow Fractionation)**, está sustituyendo a los métodos cromatográficos. El término FFF fue sugerido por Giddings para un grupo de principios de separación.²²² FFF puede considerarse como un híbrido entre la cromatografía y un método de campo impulsado, como la electroforesis o ultra-centrifugación. Sin embargo, mientras que en cromatografía las NPs se separan a lo largo de la columna como resultado de una diferente afinidad entre la fase móvil y la fase estacionaria, en FFF la separación, o fraccionamiento, solo depende del principio de separación empleado.

Las separaciones pueden producirse en base a los siguientes modos fraccionamiento: mediante **campo de flujo simétrico (F-FFF) ó asimétrico (AF-FFF), temperatura (ThFFF), sedimentación (SdFFF), gravitacional (GrFFF), campo magnético (MgFFF) ó campo eléctrico (EIFFF)**. Los dos principios más utilizados en el análisis de NPs son la sedimentación y el flujo asimétrico.

SdFFF comprende un rango de tamaños entre 50 nm hasta varios μm , mientras que FFF (con flujo simétrico y asimétrico) pueden separar moléculas o coloides en un intervalo más amplio, desde 1 nm hasta 1 μm . SdFFF ha sido utilizado tanto para la separación de coloides inorgánicos como en el análisis de células, liposomas, ADN ó ARN.²²³⁻²²⁶ Recientemente, este tipo de mecanismo acoplado al detector ICP-MS ha sido empleado para la determinación de la distribución de tamaño de NPs de TiO_2 presentes en cremas solares.²²⁷

AF-FFF ha sido también utilizada en bio-análisis, por ejemplo para polisacáridos, proteínas, unidades sub-celulares.²²⁸⁻²³² En el fraccionamiento con campo de flujo asimétrico, un flujo (*cross flow*) es aplicado perpendicularmente al canal donde tiene lugar la separación. En el interior de este canal se encuentra una membrana que actúa como filtro de corte (con un tamaño de poro específico) para diferenciar las partículas de especies iónicas o en disolución. Las NPs se separan como resultado de un equilibrio entre la fuerza aplicada perpendicularmente y su coeficiente de difusión. Este tipo de fraccionamiento puede operar en dos diferentes modos, modo normal ó modo estérico. El modo normal se establece cuando los diámetros de las partículas son mucho más pequeños que la anchura del canal y por consiguiente, tiene lugar una distribución exponencial y las partículas más pequeñas eluyen primero. Por el contrario, la elución en modo estérico tiene lugar cuando se analizan partículas

más grandes, y en este caso son las partículas de mayor diámetro las que eluyen antes (Figura 15).²³³

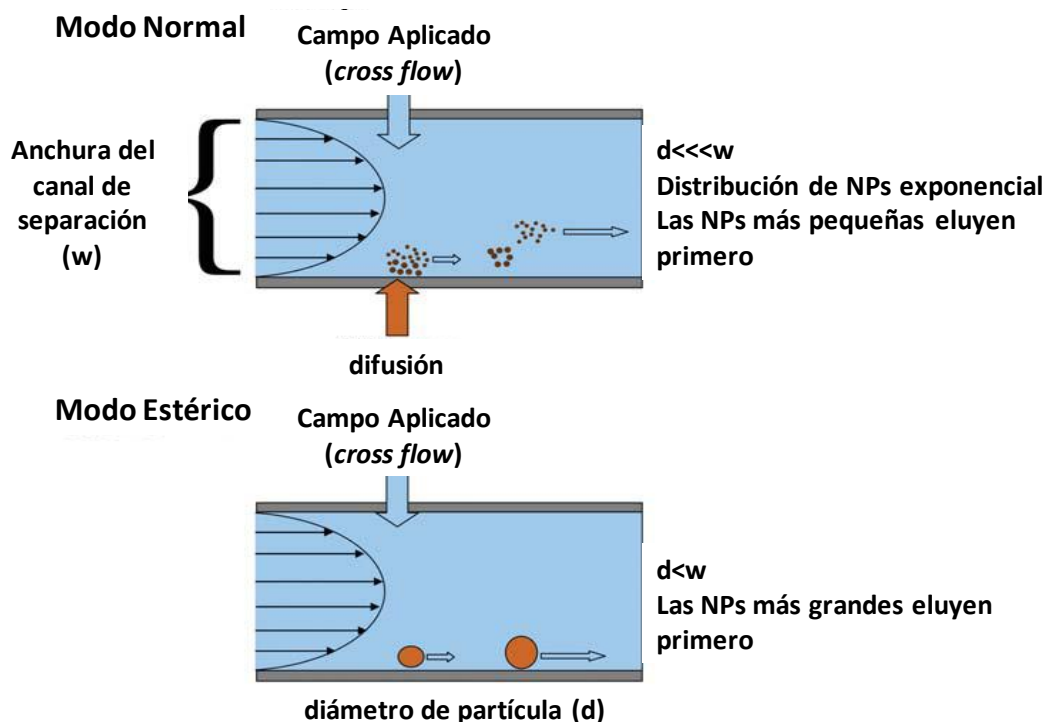


Figura 15. Representación de los posibles modos de separación en AF-FFF.

En AF-FFF multitud de parámetros influyen en la eficiencia de las separaciones debido al fenómeno de adsorción, pre-elución, a la repulsión electrostática de la membrana y a la agregación de las NPs.^{234,235} Para conseguir un fraccionamiento eficiente y cuantitativo de las NPs, en términos de recuperación, deben ser optimizadas tanto las condiciones de separación (flujo transportador, *cross flow*, volumen inyectado de muestra), como la composición de la solución transportadora (*carrier*) (composición química, fuerza iónica y pH). Esta última variable puede cambiar el comportamiento físico-químico de las NPs, y por lo tanto su retención a lo largo de la membrana.²³⁶

Los instrumentos FFF proporcionan información directa sobre los coeficientes de difusión y tamaño de las NPs de una forma directa. Generalmente, se aplican dos ecuaciones con esta finalidad: la ecuación de la teoría FFF (1) y la ecuación de Stokes-Einstein (2)²³⁷

$$(1) t_r = W^2/6D \ln(1+F_c/F_{out})$$

$$(2) D = K_B T/6\pi\eta r$$

Donde, \mathbf{tr} es el tiempo de retención, \mathbf{W} el espesor del canal, \mathbf{D} el coeficiente de difusión de las partículas, $\mathbf{F_c}$ el *cross flow* aplicado, $\mathbf{F_{out}}$ el flujo del canal, $\mathbf{K_B}$ la constante de Boltzman, \mathbf{T} la temperatura, $\mathbf{\eta}$ la viscosidad del fluido y \mathbf{r} el radio de las partículas. De este modo, el tiempo de retención se puede relacionar con el tamaño de las partículas de forma sencilla. Sin embargo, la teoría FFF no se puede aplicar en todos los análisis, ya que la información que proporciona puede ser errónea. En casos en los que las NPs se encuentren agregadas, posean una morfología diferente a la esférica o establezcan interacciones con la membrana, estas ecuaciones no son útiles, siendo necesarios otros métodos de calibración de tamaño (estándares de NPs, LSD, confirmación por microscopía electrónica).

Aunque el detector UV es generalmente el más acoplado a AF-FFF, también es posible obtener información elemental mediante el empleo de ICP-MS. Una de las principales ventajas de esta técnica hifenada (AF-FFF-ICP-MS) no es sólo la posibilidad de una detección multielemental, sino la alta sensibilidad que presenta (alcanzando los ng/L) comparada con la detección UV. En investigaciones recientes sobre la presencia de NPs de TiO_2 en cremas solares y la exposición de la especie *Daphnia magna* a QDs de CdSe/ZnS, AF-FFF-ICP-MS se aplicó para la caracterización del tamaño de partícula y su composición.²³⁸

A pesar de todas las ventajas proporcionadas por esta técnica, todavía existen algunas cuestiones que requieren una investigación más exhaustiva: problemas relacionados con la interacción membrana-NPs, el diferente comportamiento de las NPs dependiendo de su estructura química y composición, y la necesidad de optimizar los parámetros instrumentales y experimentales en cada caso, dependiendo del tipo de NPs y de la matriz. Frente a las técnicas de microscopía electrónica, AF-FFF ofrece ventajas respecto al análisis cualitativo de las NPs. La ventaja principal se basa en el número de partículas caracterizadas en cada análisis. Por ejemplo en AF-FFF, en un volumen de inyección de 50 μL de una suspensión de NPs de concentración comprendida entre 1-10 mg/L, el número de NPs (entre 1-100nm) puede oscilar entre $1000-10^7$, mientras que en TEM el número de partículas analizado es mucho menor, entre 150 y 2000. Esto se traduce en que, aunque es conveniente emplear TEM para la confirmación de los resultados, la información obtenida de AF-FFF es más representativa de la muestra.²³⁹

El análisis de NPs metálicas se encuentra en continuo desarrollo, y nuevas tendencias en el campo de la espectrometría de masas se proponen como alternativas al acoplamiento AF-FFF-ICP-MS. Este es el caso de **single-particle (sp)-ICP-MS**. El principio de sp es muy sencillo. Está basado en un análisis estadístico de la señal transiente de una única NP obtenida tras la

nebulización de dispersiones muy diluidas. Se considera que la atomización de una única partícula en el plasma produce una nube de iones cuya intensidad de señal es proporcional al tamaño de la partícula.¹⁹⁴ El empleo de esta técnica requiere un bajo coste instrumental ya que se encuentra disponible en casi todos los laboratorios equipados con ICP-MS. Sin embargo, la rápida adquisición de datos implica la necesidad de espectrómetros de masas de alta resolución. El tamaño mínimo de NPs detectado (entre 20 y 30 nm) depende de la cantidad de átomos presentes en una única partícula, y de la masa del elemento.^{240,241}

Esta técnica presenta algunas desventajas respecto a AF-FFF. En sp-ICP-MS sólo un elemento puede ser analizado y para que un análisis sea representativo, se requieren varias medidas y grandes diluciones que pueden modificar el estado de agregación de las NPs. A pesar de esto, con sp-ICP-MS se suprime cualquier tipo de interacción inespecífica entre las NPs y la membrana del sistema AF-FFF, y por consiguiente los posibles problemas relacionados con la recuperación.²³⁹

En la bibliografía más reciente se pueden encontrar varios trabajos relacionados con el empleo de sp-ICP-MS. Por ejemplo, Degueldre y col. investigaron la distribución de tamaños de NPs de Zr, Th o Au en suspensiones coloidales.²⁴²⁻²⁴⁴

II.6. Metodologías (Bio)Analíticas Empleadas en la Evaluación de los Efectos Biológicos Asociados a la Presencia de Nanopartículas Inorgánicas

Los estudios toxicológicos son cada vez más necesarios para entender tanto la interacción entre las NPs y el medio ambiente, como los efectos de éstas sobre los organismos vivos. Aunque no existen unas condiciones experimentales estándar bajo las cuales se deban llevar a cabo este tipo de ensayos, sí que se han planteado una serie de parámetros críticos que deben ser objeto de estudio: la generación de ROS, estudio de la morfología celular e integridad del citoesqueleto, funcionalidad celular y genotoxicidad.

A continuación se detallan las técnicas (bio)analíticas más comunes utilizadas en la evaluación de dichos parámetros. Éstas se pueden clasificar en: espectrofotométricas, microscópicas, técnicas de análisis celular, y herramientas proteómicas.

II.6.1. Ensayos Espectrofotométricos

La primera indicación de daño celular es la observación de una reducción de la actividad metabólica celular y/o una alteración del equilibrio entre agentes pro-oxidantes y antioxidantes intracelulares. El primer caso puede ser evaluado mediante diferentes ensayos focalizados en la medida de la viabilidad celular, mientras que la segunda respuesta puede ser observada a través de la evaluación del estrés oxidativo. Dentro de este tipo de ensayos se encuentran los métodos colorimétricos, fluorimétricos y luminiscentes, que como resultado miden la absorbancia, la fluorescencia o la señal de luminiscencia como respuesta celular a un agente externo, como son las NPs.

Medida de la Viabilidad Celular

La viabilidad celular puede ser investigada mediante diversos ensayos en los que se evalúan uno o más parámetros celulares como: **la actividad mitocondrial (empleando el método MTT, ó WST), la permeabilidad de la membrana celular (con el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH), trypan blue o ioduro de propidio), la actividad de la esterasa intracelular (empleando el agente de tinción calcein AM), ó los niveles de apoptosis (evaluando las interacciones de Anexina V o la actividad de las caspasas)**. Estos análisis requieren solamente unos pocos minutos para generar la señal de medida, lo que implica una reducción de posibles interferencias causadas por la interacción del compuesto testado con el agente químico utilizado en el ensayo.

Entre los ensayos citados anteriormente, uno de los métodos más comúnmente usados es el ensayo MTT (MTT, *(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)*).^{245,246} Está basado en la capacidad de las células para reducir la molécula de MTT a formazan con ayuda de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. El Formazan es un compuesto coloreado (azul), cuya absorbancia puede ser mediada espectrofotométricamente a 500-600 nm. Este ensayo ha sido útil en el estudio de la citotoxicidad inducida por varios tipos de NPs,²⁴⁷ y también demostrar que líneas celulares son más sensibles a los efectos derivados de un determinado tipo de NPs. En este sentido, Christen y Fent demostraron que células hepáticas humanas eran más sensibles a las NPs de SiO₂ que los fibroblastos.²⁴⁸

Evaluación del Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo está asociado a un incremento en la producción de especies oxidantes o a una significativa disminución de las defensas antioxidantes celulares. Cuando las células son expuestas a condiciones de estrés pueden generar especies reactivas de oxígeno, entre las que

se encuentran radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), aniones superóxido (O_2^-), y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Cuando la concentración de estas especies es muy elevada, se produce daño celular e incluso apoptosis. Muchos estudios han considerado el aumento de los niveles de ROS como uno de los efectos inducidos por las NPs. Uno de los ensayos más usados para medir la producción intracelular de ROS es el **diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA, *Dichlorodihydro-fluorescein diacetate*)**. Este agente químico penetra en las células, donde se hidroliza por esterasas inespecíficas y en presencia de especies oxidantes se convierte en su metabolito 2,4-diclorofenol (2,4-DCF), un producto fluorescente de color verde.^{249,250} Siguiendo este procedimiento, Konczol y col. demostraron que la producción de ROS en células epiteliales aumentó tras la incubación con NPs de Fe_2O_3 en una manera dependiente de la concentración.²⁵¹ El empleo del compuesto **dihidroetidio (DHE, *dihydroethidium*)** se considera otro ensayo alternativo.²⁵²

Se ha demostrado que cuando los niveles de ROS aumentan, generalmente se desencadenan otros eventos intracelulares como la peroxidación lipídica. Por lo tanto, el daño oxidativo también se puede evaluar a través de otros mecanismos secundarios. En el caso concreto de la peroxidación lipídica, el **malondialdehído (MDA, *malondialdehyde*)** generado tras la ruptura de los ácidos grasos poli-insaturados se utiliza como parámetro para determinar la presencia de reacciones de peroxidación lipídica. Los niveles de MDA pueden ser medidos por Western Blot (técnica analítica que permite evaluar la expresión de MDA utilizando el anticuerpo correspondiente),²⁵⁰ ELISA (técnica de inmunoensayo en la cual se detecta un antígeno inmovilizado gracias a la interacción entre un anticuerpo y una enzima capaz de generar un producto detectable mediante un cambio de color), ó por el tradicional ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, *thiobarbituric acid reactive substances*); basado en la reacción entre el MDA con el ácido tiobarbitúrico para formar un producto fluorescente cuya intensidad puede ser fácilmente mediada mediante espectrofotometría.⁴⁸ Los resultados obtenidos por Passagne y col. tras emplear este ensayo en células de diferente tipo, confirmaron que la producción de MDA estaba directamente influenciada por la línea celular y el tamaño de las NPs de SiO_2 empleadas.²⁵²

Por último, otra forma muy común de evaluar el estrés oxidativo es medir los niveles de la **enzima glutatión (GSH, *glutathione*)**. Este compuesto intracelular de bajo peso molecular tiene un papel muy importante en la defensa de las células contra el estrés oxidativo y se ha usado en muchos ensayos toxicológicos.²⁵³

II.6.2. Técnicas Microscópicas

El primer paso en cualquier ensayo de toxicidad que esté enfocado a obtener información sobre los efectos de las NPs en organismos, es la caracterización de las NPs empleadas en el estudio. Como se ha comentado anteriormente en la sección II.5.1., referida a las *“Análisis Cualitativo: Caracterización y Detección de NPs”*, las herramientas de microscopía electrónica (mayoritariamente TEM y SEM) son muy adecuadas a la hora de proporcionar información útil sobre el tamaño, forma, estado de agregación y morfología superficial de las NPs. Además de ser utilizadas para estos fines, su empleo es esencial a la hora de llevar a cabo estudios in vitro. En concreto, **TEM, SEM y AFM** se utilizan frecuentemente como herramientas complementarias para evaluar la **interacción entre las NPs y distintas líneas celulares**. En este tipo de ensayos biológicos, los componentes del medio de cultivo de las células (proteínas, antibióticos, vitaminas y electrolitos) pueden absorberse sobre la superficie de las NPs, cambiando su tamaño y química superficial, y como consecuencia alterar su estado de agregación.^{254,255}

Además de definir las propiedades físico-químicas de las NPs y controlar la estabilidad de las dispersiones, la microscopía electrónica es una técnica muy útil en experimentos de citotoxicidad ya que, por un lado SEM permite la visualización de alteraciones en la morfología celular²⁵⁶ y por otro lado, TEM hace que sea posible la distinción de NPs localizadas en el interior de la célula ó tejidos de aquellas que se encuentran adheridas a la superficie.²⁵⁷

La presencia de **alteraciones en la morfología celular** es uno de los principales parámetros que nos ayudan a entender los efectos desencadenados cuando las células se exponen a agentes citotóxicos. Así, alteraciones en la morfología de fibroblastos de pulmón se examinaron por SEM tras su exposición a NPs de ZnO. Como resultado se observó que la superficie celular de las células tratadas presentaba rugosidades en varias zonas en comparación con las células control.²⁵⁷ Otros autores han empleado la **Microscopía de Contraste de Fases (PCM, Phase Contrast Microscopy)**, que permite la visualización de células en su estado natural, sin necesidad de etapas previas de fijación y deshidratación,²⁵⁵ para observar cambios morfológicos en células de hígado de rata expuestas a NPs de Ag.²⁵⁸

Los efectos citotóxicos de las NPs sobre una determinada línea celular pueden diferir dependiendo del tiempo de exposición y la concentración de NPs en el medio de cultivo. Es importante comentar que el número de NPs que realmente se asimilan por las células puede variar de la concentración inicial empleada en el tratamiento varios órdenes de magnitud,²⁵⁹ y que la influencia de estas partículas sobre los efectos citotóxicos desencadenados es mucho

mayor que la de la concentración añadida al medio de cultivo. Por este motivo, la obtención de información sobre la **localización intracelular de las NPs** es de vital importancia para poder establecer las interacciones que tienen lugar entre las NPs y células. La asimilación de NPs por parte de la célula no sólo depende de la concentración inicial de éstas, sino de otras propiedades como el tamaño, forma, sitios activos superficiales, etc... Prueba de esto es que las NPs más pequeñas son consideradas más tóxicas ya que son capaces de penetrar en las células más fácilmente que las de mayor tamaño.²⁶⁰ Como ya se ha comentado anteriormente, TEM se considera una técnica adecuada para distinguir entre las NPs localizadas en el interior de la célula de aquellas que se encuentran adheridas a su superficie. A la hora de llevar a cabo un análisis de este tipo es necesario emplear agentes fijadores como: aldehídos (glutaraldehído y paraformaldehído), que se unen a grupos amino preservando la estructura celular, y tetraóxido de osmio, usado generalmente como fijador secundario, que se une a lípidos insaturados y a algunas proteínas mejorando la densidad electrónica.^{160,261,262}

Además de la microscopía electrónica, existen otras técnicas como la **técnica de imagen de ultra-alta resolución (URI, *Ultrahigh Resolution Imaging*)**. Ésta es una técnica que permite observar las interacciones entre NPs y células de una manera directa, sin necesidad de una tediosa preparación de muestra y sin la utilización de agentes fluorescentes. Simplemente, cambiando el plano focal se pudo verificar que agregados de NPs de TiO₂ habían sido asimilados por las células.¹⁶⁰

Otra opción para visualizar las NPs en el interior celular es la funcionalización con marcadores fluorescentes, utilizados en **Microscopía de Fluorescencia (FM, *Fluorescence Microscopy*)** o **CLM**. Sin embargo es importante comentar que la funcionalización de las NPs puede alterar sus propiedades físico-químicas. Entre los fluorocromos más utilizados en bioanálisis se encuentran: FITC, ALEXA 488, BODIPY-FL, yoduro de propidio, Mito-Tracker Red y Rodamina, entre otros. Al-Rawi y col. utilizaron marcadores fluorescentes para observar la localización de NPs de SiO₂ en mitocondrias, endosomas, lisosomas y núcleos de células de adenocarcinoma de útero humano (HeLa).²⁶³

Por último, la **Microscopía de Campo Oscuro (DFM, *Dark Field Microscopy*)** es capaz de proporcionar una visión general de las NPs no fluorescentes en el interior de las células, ya que como resultado se ve una imagen brillante superpuesta a un campo oscuro. Los estudios utilizando esta técnica son muchos más limitados, y comúnmente es empleada en el análisis de NPs de Au.²⁶¹

II.6.3. Técnicas de Análisis Elemental

Generalmente, la técnica **ICP-MS** es la más utilizada con el fin de proporcionar análisis cuantitativos de la asimilación de NPs en diferentes organismos y líneas celulares.⁴¹ Los análisis elementales llevados a cabo mediante ICP-MS también permiten diferenciar entre las posibles fuentes de citotoxicidad, es decir, si los efectos tóxicos observados son debidos a la presencia de NPs o más bien a la oxidación de éstas a sus correspondientes especies iónicas.²⁶² **ICP-OES** también ha sido empleado para llevar a cabo la cuantificación de NPs en varios trabajos.²⁶⁴ Los análisis obtenidos mediante ICP-OES corroboraron que la interacción entre las NPs de SiO₂ no porosas, NPs de SiO₂ mesoporosas, NPs de TiO₂, y mastocitos dependía en gran medida de que la superficie de las NPs estuviese modificada químicamente, más que de la composición elemental.²⁶⁵

II.6.4. Técnicas de Análisis Celular: Citometría de Flujo

La **citometría de flujo (FC, Flow Cytometry)** es una técnica de análisis celular que mide las características morfológicas (mediante la dispersión de luz) y antigénicas (mediante la señal de fluorescencia) que poseen las células.

Los citómetros de flujo constan de una fuente de excitación (láser) y de un sistema colector para generar y recoger las señales luminosas a determinadas longitudes de onda, y posteriormente dirigir las hacia los detectores ópticos. Las células se introducen en el citómetro en suspensión mediante un sistema hidráulico.

Esta técnica es muy versátil y se puede aplicar en el análisis de diferentes niveles celulares: a nivel molecular (proteínas extracelulares, secuencias de ADN ó ARN), a nivel subcelular (liposomas, núcleos, cromosomas y otros orgánulos aislados), a nivel celular (bacterias, hongos, células animales y vegetales) y a nivel supracelular (organismos pluricelulares y fusiones celulares). En ensayo citotóxicos, FC se suele emplear tanto para determinar el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, como para estudiar posibles respuestas apoptóticas o necróticas.

Distribución de Fases del Ciclo Celular

Uno de los efectos más comunes observados en las células tras su exposición a las NPs es la alteración de su proliferación y desarrollo celular. Mediante FC, se puede determinar el **contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular** (sub-G0, G0/G1, S, G2/M), con el fin

de evaluar posibles alteraciones (Figura 16). Para ello se utilizan marcadores fluorescentes como Hoechst, DAPI, Naranja de acrimina, yoduro de propidio o rh12. Entre los más utilizados se encuentra el Hoechst 33342 que es un fluorocromo no covalente permeable a la membrana plasmática. Tiene especificidad por los pares de bases Adenina-Timina, tiñendo de esta manera el DNA. El Hoechst puede usarse tanto en células vivas como fijadas, y se emplea a menudo en sustitución de otro fluorocromo: el DAPI. El Hoechst 33342 presenta un grupo etilo adicional respecto al DAPI, lo que le da un comportamiento más lipofílico y la capacidad de atravesar más fácilmente la membrana celular. La luz fluorescente emitida por las células marcadas es proporcional al contenido de DNA de cada célula, y el porcentaje de células en cada fase del ciclo se calcula de una manera muy sencilla mediante un programa informático.²⁶⁶

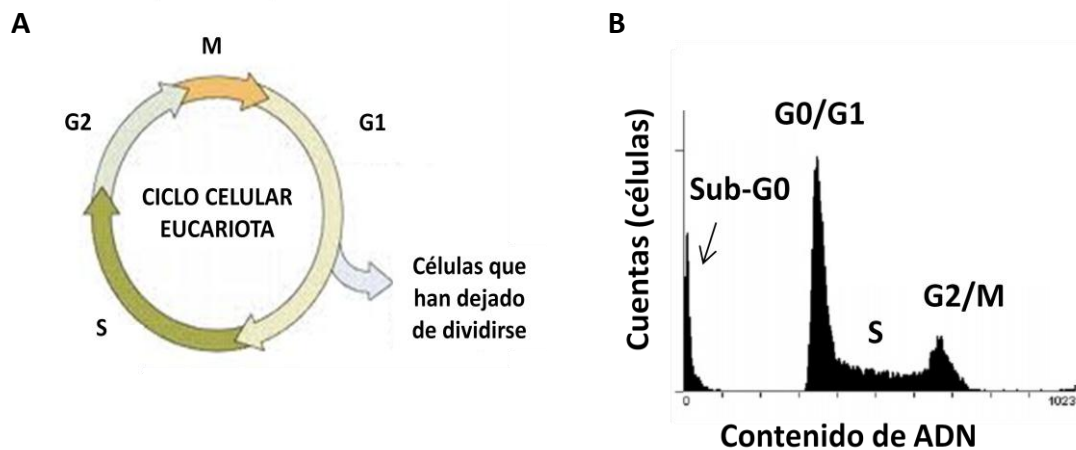


Figura 16. Esquema del ciclo celular de un célula eucariota (A). Histograma obtenido tras el análisis de la distribución de fases del ciclo celular mediante FC (B). Los procesos que tienen lugar en cada fase son los siguientes: Sub-G0 (células pro-apoptóticas que han parado su división), G0/G1 (fase de crecimiento celular), S (tiene lugar la síntesis y replicación de ADN) y G2/M (se producen la síntesis de proteínas, cambios en la estructura celular y por último la división celular).²⁶⁷

AshaRani y col. estudiaron la distribución de las fases del ciclo celular de fibroblastos de pulmón y glioblastomas humanos con el fin de evaluar el daño inducido por las NPs de Ag. Un incremento del porcentaje de células en la fase S respecto a las células control, corroboró que las NPs de Ag eran capaces de bloquear el ciclo celular en la fase de replicación del ADN y división celular (fase G2/M), y por lo tanto inhibir la proliferación.²⁶⁸

Medida del Grado de Apoptosis

A pesar de que existen varias estrategias para evaluar la apoptosis celular (utilizando proteínas como marcadores, como Bax, Bcl2, p53 y caspasas,²⁴⁹ ensayos colorimétricos,²⁶⁹ PCR²⁶⁰ u observando la condensación de cromatina bajo microscopía de fluorescencia²⁷⁰), FC se presenta en numerosos estudios como la técnica más adecuada.

La mitocondria actúa como punto de integración de las señales apoptóticas originadas tanto por mecanismos extrínsecos como intrínsecos, la **pérdida de potencial de membrana mitocondrial** puede estar asociada a la activación de las caspasas y a la consiguiente activación de las cascadas apoptóticas.²⁷¹ Mediante FC, Chen y col. demostraron que las NPs de Se potenciaban la apoptosis de células de melanoma humanas. El porcentaje de células con la membrana despolarizada aumentó aproximadamente un 25 % cuando las células fueron tratadas con las NPs.²⁹²

La **anexina V** es el nombre de otro ensayo empleado en FC. La anexina-V es una proteína que se une específicamente al fosfolípido fosfatidilserina (PS, *phosphatidylserine*), el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en la cara externa de dicha membrana cuando comienza el proceso de apoptosis (muerte celular “programada” ante estímulos extra o intracelulares). De esta forma, la anexina V conjugada con un fluoróforo como el FITC, puede identificar selectivamente a las células apoptóticas uniéndose a la PS. La anexina V se utiliza generalmente junto con el yoduro de propidio (IP, *propidium iodide*). El IP es un fluorocromo no covalente que se une al ADN celular de células en las cuales la membrana celular está totalmente dañada. De esta forma es posible diferenciar a las células necróticas (muerte celular provocada por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no se puede reparar).²⁷²

Como cualquier técnica de análisis, la FC presenta ventajas e inconvenientes. Entre sus ventajas destacan: el análisis de un número significativo de células, la posibilidad de medir células individuales, y de utilizar múltiples marcajes en una sola célula con el objetivo de evaluar diferentes parámetros. Sin embargo, la información sobre la morfología celular es escasa y es incapaz de proporcionar información de la localización celular en un tejido. Otro de los inconvenientes que puede presentar son los falsos positivos que se pueden generar tras la internalización o adhesión de las NPs a la membrana celular, dificultando la correcta unión de las moléculas diana utilizadas.²⁷³

II.6.5. Proteómica Cuantitativa

Las plataformas bio-analíticas basadas en la expresión de proteínas y genes proporcionan información muy útil acerca de los mecanismos específicos de interacción entre NPs y células.

Entre las metodologías proteómicas disponibles, las estrategias cuantitativas son muy atractivas ya que permiten la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas en las células expuestas a las NPs.

Cuantificación de Proteínas basada en el Marcaje Isotópico y la Espectrometría de Masas

En la proteómica basada en la espectrometría de masas, la cuantificación se lleva a cabo normalmente marcando las proteínas o péptidos mediante isótopos estables, de manera que una de la muestras se marca con un isótopo ligero (o natural), mientras que la otra se marca con el isótopo pesado correspondiente. Los péptidos así marcados producen, en el análisis de MS, parejas de picos con una diferencia de masa correspondiente a la de los isótopos usados.

La mayoría de las técnicas de marcaje isotópico están basadas en la cuantificación a nivel de los espectros de MS, de manera que se buscan las señales que difieren entre sí por una variación específica en su relación m/z y la concentración relativa de un péptido dado se obtiene por comparación de las intensidades de las señales correspondientes (Figura 17).



Figura 17. Diseño experimental de un ensayo proteómico. El esquema de trabajo normalmente comprende dos fases: el **marcaje cuantitativo** de la muestra biológica, donde tiene lugar la preparación de la muestra, y la **cuantificación de las proteínas**, que implica el fraccionamiento de la muestra, el análisis por espectrometría de masas (MS) y la evaluación de los datos obtenidos.

1. Marcaje Cuantitativo de Proteínas: Marcaje Metabólico Mediante Isótopos Estables



Los isótopos estables pueden ser incorporados metabólica-, química- o enzimáticamente a las proteínas o péptidos presentes en la muestra.²⁷⁴⁻²⁷⁶ En la Figura 18, aparecen esquematizadas las distintas vías de incorporación isotópica utilizadas en proteómica cuantitativa.

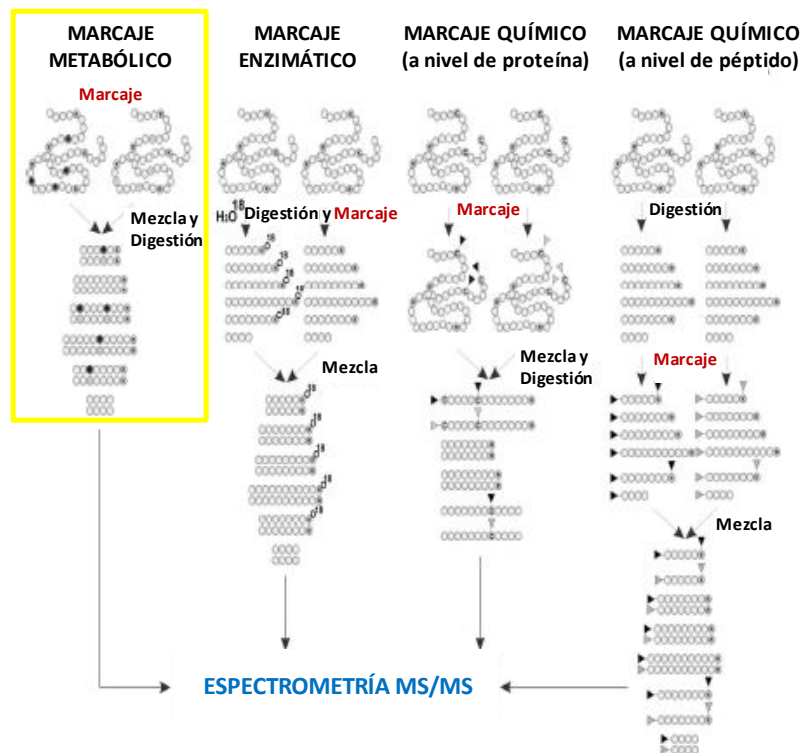


Figura 18. Diferentes posibilidades para el marcaje de péptidos y proteínas mediante isótopos estables. En el **marcaje metabólico**, estrategia seguida en la presente tesis doctoral, dos líneas celulares cuyos proteomas se quiere comparar se cultivan en medios normales o enriquecidos con compuestos marcados con isótopos estables. Tras su crecimiento, los isótopos distintivos habrán sido incorporados a las proteínas celulares producidas y, una vez extraídas, pueden ser combinadas, digeridas enzimáticamente y analizadas como una sola muestra. En el **marcaje enzimático** dos muestras de proteínas se digieren enzimáticamente en presencia de “agua ligera” (H_2O^{16}) o “agua pesada” (H_2O^{18}), de manera que el oxígeno marcado se incorpora a los péptidos resultantes como marcador distintivo. Tras la digestión, los péptidos pueden ser combinados y procesados como una muestra única. En el **marcaje químico a nivel de proteína (ICAT, Isotope-Coded Affinity Tag)**, las proteínas de dos muestras son marcadas usando los reactivos del método de marcaje ICAT. Tras el marcaje las proteínas se digieren enzimáticamente y combinan antes del análisis de MS. Finalmente, en el **marcaje químico a nivel peptídico (iTRAQ, Isotope Tagged Relative and Absolute Quantification)**, las proteínas de distintas muestras se digieren separadamente hasta sus péptidos resultantes y tras la digestión cada péptido es marcado usando reactivos de estructura química semejante, pero que difieren en la composición del isótopo estable. Tras el marcaje las muestras se combinan antes de ser analizadas.

En las primeras publicaciones sobre marcaje metabólico se usaron medios enriquecidos con los isótopos N^{15} y C^{13} .^{277,278} Este método presentó algunos inconvenientes relacionados con la identificación de los espectros. En la mayoría de los casos, los cambios de masa de los péptidos no pudieron predecirse dado que, tanto los átomos de nitrógeno de la cadena principal, como los de las cadenas laterales se hallaban marcados, hecho que hace más complicada la cuantificación de los péptidos presentes en las mezclas complejas. El desarrollo del **marcaje isotópico estable de los aminoácidos en cultivo celular (SILAC, *Stable isotope labeling with amino acids in cell culture*)**, ha evitado el problema encontrado con el marcaje de N^{15} y C^{13} .²⁷⁹ Entre las diferentes estrategias definidas en proteómica cuantitativa, SILAC es recomendado para el marcaje de líneas celulares, ya que prácticamente cualquier cultivo celular puede ser marcado mediante SILAC.²⁸⁰

SILAC se basa en la comparación, a nivel de contenido proteico, de dos estados celulares diferentes (*e.g.* células procedentes de un tejido sano vs. células procedentes de un tejido enfermo, células tratadas con un determinado fármaco vs. células sin tratar, células expuestas a un determinado tóxico vs. células en condiciones normales, etc.) y se utiliza para la identificación y cuantificación de proteínas diferencialmente expresadas entre dichos estados. De esta forma, podremos afirmar que proteínas cuya abundancia sea diferente en ambos estados, lo que se denomina proteínas de-reguladas, estarán probablemente implicadas en el proceso objeto de estudio (*e.g.* enfermedad, tratamiento farmacológico, toxicidad de un determinado compuesto, etc.), y será dicho proceso el causante o la consecuencia de dicha de-regulación. El procedimiento general de un experimento SILAC aparece esquematizado en la Figura 19.

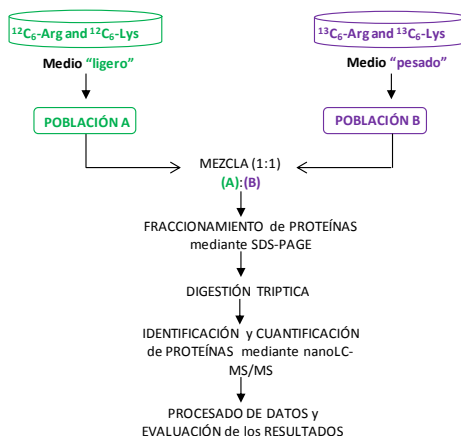


Figura 19. Dos poblaciones celulares, A y B, se cultivan en medios idénticos, excepto por la sustitución de una serie de aminoácidos (aa) en uno de los medios por su versión "pesada", es decir, un aa en el que los átomos de ^{12}C se sustituyen por ^{13}C . La incorporación de los aa "pesados" a las proteínas de la célula se realiza de forma metabólica,

de forma que tras 5-6 duplicaciones de la población celular, se consigue obtener una eficiencia de marcaje del 100%. De este modo, se obtiene una población B donde todas las proteínas están marcadas isotópicamente con uno o varios aa “pesados” frente a una población A, donde todas las proteínas tienen todos sus aa en su forma normal ó “ligera”. Una vez marcadas, las dos poblaciones se mezclan en relación 1:1 y se prosigue con el proceso analítico, el cual incluye etapas de separación y digestión de las proteínas. Como resultado, en el espectro de masas, cada péptido detectado aparecerá como un doblete consecuencia de la diferencia isotópica (correspondientes a la forma ligera y pesada del péptido).

En el marcaje metabólico SILAC es muy importante conocer el llamado **cociente SILAC**, ya que es este valor es el que nos proporcionará la información necesaria para saber si la expresión de una determinada proteína se encuentra de-regulada (sobre-expresada o inhibida). El cociente SILAC es calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$R_{SILAC} = \frac{I_pA / I_LA + I_pB / I_LB + I_pn / I_Ln}{n}$$

A y B son las dos poblaciones
 I_p es la intensidad de pico del péptido “pesado”
 I_L la intensidad de pico del péptido “ligero”

Cuando una proteína presente un cociente SILAC $R_{SILAC} = 1$, nos encontraremos ante una proteína cuya abundancia relativa es la misma en las dos poblaciones celulares, o lo que es lo mismo, una **proteína cuya expresión no se ha visto modificada** tras el agente tóxico o tratamiento testado. Proteínas cuyo cociente SILAC sea $1 > R_{SILAC} > 1$ representarán a proteínas cuya abundancia entre los dos estados es diferente, y por tanto, se tratará de proteínas **implicadas en el proceso** objeto de estudio (Figura 20).²⁸⁰

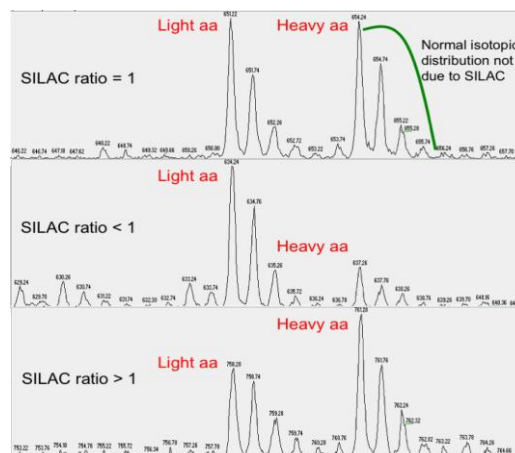


Figura 20. Espectros de MS donde se muestran diferentes pares de péptidos con diferentes cocientes SILAC.

A continuación, en la Tabla 4, se comentan las ventajas que ofrece esta metodología frente a otros tipos de marcaje comentados anteriormente (enzimático y químico).

Tabla 4. Ventajas (en azul) de las estrategias de marcaje isotópico frente a los inconvenientes (en rojo) de otros tipos de marcajes (enzimático y químico)

Marcaje Metabólico	Marcaje Enzimático y Marcaje Químico
Los marcadores isotópicos son muy utilizados para el análisis de mezclas complejas de proteínas .	Marcaje enzimático: Necesario un fraccionamiento cuidadoso de la muestra.
No son necesarios pasos de purificación .	La eficiencia de la incorporación del O¹⁸ durante la digestión de tripsina puede ser inferior al 50% , lo que complica la cuantificación.
Compatible con las condiciones de cultivo celular .	
Las muestras (células) se mezclan y se procesan juntas, por lo que la pérdida de muestra o interfactos derivados del tratamiento de muestra no afectan a la precisión de la cuantificación .	Marcaje químico:
El grado de incorporación de los aa es prácticamente del 100%	Se requirieron modificaciones químicas y pasos de purificación , que pueden resultar complicadas en el caso de disponer de poca cantidad de muestra.
Cuantificación de proteínas de bajo peso molecular , y aquellas que no contienen residuos de cisteína .	En iTRAQ, los péptidos son marcados tras la digestión de las proteínas, lo que se puede traducir en una mayor acumulación de errores a lo largo del procedimiento.
Se requieren células vivas .	

2. Cuantificación de Proteínas mediante Espectrometría de Masas



Una vez que se ha conseguido el marcaje metabólico, el siguiente paso es la cuantificación de las proteínas, para lo que son necesarias etapas de fraccionamiento, análisis por espectrometría de masas y el análisis de los datos obtenidos. Aunque en proteómica cuantitativa, la abundancia de las proteínas se puede medir durante el fraccionamiento de la muestra (proteómica cuantitativa basada en la electroforesis bidimensional), en este caso nos vamos a centrar únicamente en el análisis de MS (proteómica cuantitativa basada en la espectrometría de masas).²⁸¹

Para el **fraccionamiento de las proteínas** de una muestra, la **electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis)** es la modalidad más utilizada. El SDS es un detergente aniónico que actúa rompiendo las interacciones hidrofóbicas de las proteínas desnaturalizándolas, es decir, rompiendo su estructura terciaria. Las proteínas desnaturalizadas adoptan una estructura en forma de bastoncillo con una serie de moléculas de SDS cargadas negativamente que rodean la cadena polipeptídica. Al formarse el complejo SDS-proteína, se observa un valor constante de la relación carga/masa, consiguiéndose por tanto, una separación de las proteínas en base a su tamaño, ya que la velocidad de migración desde el cátodo al ánodo es función directa de su peso molecular. Además de la adición de SDS a la muestra, se suele emplear un agente reductor, como el ditioneitol (DTT) o el 2-mercaptoetanol (β -ME), que ayuda a la desnaturalización de las proteínas reduciendo los enlaces disulfuro y desplegando, por tanto, algunas formas conformacionales terciarias.

Una vez realizada la electroforesis hay que proceder a la tinción del gel para poder visualizar las proteínas separadas. Existen diferentes reactivos para la tinción de geles siendo los más utilizados el azul de Coomassie (CBB) y el nitrato de plata.²⁸²

El siguiente paso es el **análisis de las proteínas mediante la espectrometría de masas molecular**. Esta técnica analítica que se emplea para determinar la masa molecular de un compuesto mediante el uso de una instrumentación adecuada que pueda medir la relación masa/carga (m/z) de iones y que generalmente opera en condiciones de vacío.²⁸³ Los espectrómetros de masas se componen de tres elementos básicos: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector.

A continuación se comentan brevemente las diferentes alternativas en cuanto a fuente de ionización y a analizadores más utilizados para el análisis de proteínas y péptidos.

Fuentes de ionización: En sus inicios, la MS no podía aplicarse al análisis de proteínas debido a la ausencia de técnicas de ionización suaves que permitieran realizar el paso de macrobiomoléculas a iones en fase gaseosa sin una fragmentación excesiva. A finales de los años 90 se desarrollaron dos técnicas de ionización que permitieron el análisis de proteínas y péptidos, entre otras biomoléculas, mediante MS: **ESI** y **MALDI**.²⁸⁴ Como se ha comentado en la sección 1.5.2. *“Separación e Identificación de Especies de Selenio”*, la ionización por ESI permite acoplar métodos de electroforesis capilar y cromatografía líquida directamente al

espectrómetro de masas, lo que permite realizar la identificación a gran escala de mezclas complejas de proteínas.²⁸⁵

Analizadores de masas: Los analizadores más utilizados en la identificación de proteínas y péptidos son: **trampa iónica (IT, Ion Trap)** (caracterizada por su alta sensibilidad y robustez), **cuádruplo (Q, Quadrupole)**, el analizador de **tiempo de vuelo (TOF, Time Of Flight)**, el analizador de **resonancia ciclotrónica de iones mediante transformada de Fourier (FT-ICR, Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)** (es el analizador que mayor exactitud proporciona en la determinación de los valores m/z , pero su mantenimiento es muy costoso), y el **Orbitrap** (su alta sensibilidad y resolución lo hacen especialmente adecuado para la identificación de proteínas poco abundantes).²⁸⁶

La **combinación de la nanocromatografía líquida (nanoLC) y tándem masas (MS/MS)** es una aproximación multidimensional que permite la identificación de las proteínas que componen un proteoma de una manera más profunda y con un mayor intervalo dinámico y precisión en las cuantificaciones realizadas que cuando se utilizan técnicas de MS unidimensional, en las que todos los iones se obtienen a partir de un solo espectro de masas. Típicamente, en este tipo de aproximaciones, la mezcla de proteínas digeridas previamente con tripsina u otra proteasa se fracciona mediante nanoLC antes de ser analizada en el espectrómetro de MS/MS. Estos dos sistemas pueden estar conectados en línea de manera que la muestra procedente del capilar de la columna cromatográfica fluye directamente dentro de la fuente de ESI, o por el contrario no estarlo, haciéndose uso de un colector de fracciones que va recuperando los eluidos de péptidos para su posterior análisis por MS.

Los principios básicos de la nanoLC son los mismos que de la LC normal; no obstante, la miniaturización proporciona una serie de **ventajas** que se detallan a continuación:

- Se reduce drásticamente el consumo de disolventes orgánicos perjudiciales para el medio ambiente.
- La disminución del diámetro interno de la columna analítica incrementa la sensibilidad y disminuye la cantidad de muestra necesaria. Este aspecto es especialmente importante para la identificación de proteínas poco abundantes.
- La disminución del tamaño de partícula del empaquetamiento cromatográfico se traduce en un estrechamiento de los picos cromatográficos aumentándose, por tanto, la eficacia de la separación. Este aspecto es muy importante para poder conseguir la resolución isotópica necesaria en las diferentes estrategias de cuantificación de proteínas.

- La disminución del caudal y del diámetro interno de las conexiones facilita su acoplamiento directo a la fuente de nanoelectrospray del espectrómetro de masas de manera que los péptidos se pueden ir detectando conforme son eluidos de la columna.

Herramientas Informáticas para la Identificación de Proteínas

La identificación de proteínas a partir de la huella peptídica (PMF, *Peptide Mass Fingerprinting*), obtenida por MS o a partir de los espectros de fragmentación y secuenciación de péptidos mediante MS/MS, son las aproximaciones basadas en la espectrometría de masas más utilizadas para la identificación de proteínas en los estudios proteómicos. Se han desarrollado distintas herramientas informáticas que asisten en la identificación de proteínas mediante ambos métodos. Para PMF estos programas informáticos comparan el valor m/z de cada péptido del espectro de masas experimental con los valores teóricos derivados de bases de datos como la del UniProt (accesible en: <http://www.uniprot.org/>) o la del NCBI (accesible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).^{287,288} Distintos tipos de herramientas tales como Mascot, MS-Fit, Profound, PeptideSearch, PeptIdent, Aldente y PepFrag, permiten evaluar la similitud entre los valores m/z de los espectros MS experimentales obtenidos y los teóricos. Todos estos programas asignan una puntuación, valor probabilístico o *score* estadístico que indica lo bien correlacionados que se encuentran entre sí los valores experimentales y los teóricos.

La secuenciación por MS/MS puede llevarse a cabo por comparación con la información presente en las bases de datos (PFF, *Peptide Fragment Fingerprinting*). Esta última opción se usa normalmente para la identificación de las proteínas presentes en mezclas complejas y cuando hay disponibilidad de acceso a la información genómica del organismo estudiado. En los análisis de MS/MS automatizados, el espectrómetro de masas selecciona los picos del primer espectro MS obtenido (iones precursores o parentales), para su fragmentación y posterior análisis de los espectros de fragmentación resultantes (o espectros de MS/MS). Estos análisis generan cientos de espectros por hora, lo que requiere del uso de programas eficientes con los que llevar a cabo el análisis de los datos. Los análisis proteómicos a gran escala se han visto beneficiados por el desarrollo de múltiples paquetes informáticos que permiten el análisis de los datos presentes en los espectros de MS/MS. Algunos de estos son Mascot, Sequest, ProbiD], Phenyx, XITandem, GutenTag, NoDupe y Sonar MS/MS. Muchas de estas herramientas (como Mascot y Sequest, por ejemplo), se basan en el ion precursor, utilizando la masa de este ion como principal criterio de búsqueda.²⁸⁹ Cada una de estas herramientas informáticas aplica distintos algoritmos especializados y funciones de *score* que

tienen en cuenta los diferentes factores que influyen en la identificación de proteínas (por ejemplo, aa modificados, mutaciones y variantes post-traduccionales de las proteínas, etc...).

II.7. Referencias Bibliográficas

1. P.J.A. Borm, D. Robbins, S. Haubold, T. Kuhlbusch, H. Fissan, K. Donaldson, R. Schins, V. Stone, W. Kreyling, J. Lademann. *Particle Fibre Toxicol.*, 3 (2006) 11.
2. P.V. Kamat. *J. Phys. Chem. B.*, 106 (2002) 7729.
3. M.F. Hochella. *Earth Planet Sci. Lett.*, 203 (2002) 593.
4. D.J. Burleson, M.D. Driessen, R.L. Penn. *J. Environ. Sci. Health. A.* 39 (2004)2707.
5. J.F. Banfield, H.Z. Zhang. *Nanoparticles Environ.*, 44 (2001)1.
6. A.S. Madden, M.F. Hochella. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 69 (2005) 389.
7. M.C. Roco. *J. Nanopart. Res.*, 7 (2005)129.
8. C. Buzea, I.I. Pacheco Blandino, K. Robbie. *Biointerphases*, 2 (2007) MR17.
9. N.C. Mueller, B. Nowack, *Environ. Sci. Technol.*, 42 (2008) 4447.
10. Y. Li, P. Leung, L. Yao, Q.W. Song, E. Newton. *J. Hosp. Infect.*, 62 (2006) 58.
11. K.B. Jirage, J.C. Hulteen, C.R. Martin. *Science*, 278 (1997) 655.
12. K.E. Uhrich, S.M. Cannizzaro, R.S. Langer, K.M. Shakeshelf. *Chem. Rev.*, 99 (1999) 3181.
13. N.L. Rosi, C.A. Mirkin. *Chem. Rev.*, 105 (2005) 1547.
14. S.H. Friedman, D.L. De Camp, R.P. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, G.L. Kenyon. *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 6506.
15. H. Jang, S. Kim. *J. of Nanoparticle Research*, 3 (2007) 141.
16. M. Auffan, J. Rose, T. Orsiere, M. de Meo, A. Thill, O. Zeyons, O. Proux, A. Masion, P. Chaurand, O. Spalla, A. Botta, M. R. Wiesner, J. Y. Bottero. *Nanotoxicology*, 3 (2009) 161.
17. K. Zhou, R. Wang, B. Xu, Y. Li. *Nanotechnology*, 17 (2006) 3939.
18. A. K. Gupta, M. Gupta. *Biomaterials*, 6 (2005) 3995.
19. C. Roney, P. Kulkarni, V. Arora, P. Antich, F. Bonte, A. Wu, N.M. Mallikarjuana, S. Manohar, H.F. Liang, A.R. Kulkarni, H.W. Sung, M. Sairam, T.M. Aminabhavi. *J. Controlled Release*, 108 (2005) 193.
20. <http://www.newscientist.com/>
21. C.R. Martin, P. Kohli. *Nature Rev. Drug Discovery* 2 (2003) 29.
22. <http://www.agerarx.co.uk/whatisagera.asp>
23. L. Xiao, H. Takada, K. Maeda, M. Haramoto, N. Miwa. *Pharmacol.*, 59 (2005)351.
24. <http://www.nanotechproject.org/index.php?id=44>
25. <http://www.foe.org/camps/comm/nanotech/>
26. T.G. Smijs, S. Pavel. *Nanotechnology, Science and Applications*, 4 (2011) 95.
27. J.H. Hafner, C.L. Cheung, A.T. Woolley, C.M. Lieber. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 77 (2001) 73.

28. D.R. Larson, W.R. Zipfel, R.M. Williams, S.W. Clark, M.P. Bruchez, F.W. Wise. *Science*, 300 (2003) 1434.
29. M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A.P. Alivisatos. *Science*, 281 (1998)2013.
30. W.C.W. Chan, S. Nie, *Science*, 281 (1998) 2016.
31. H. Mattoussi, J.M. Mauro, E.R. Goldman, G.P. Anderson, V.C. Sundar, F. V. Mikulec, M.G. Bawendi. *J. Am. Chem. Soc.*, 122 (2000) 12142.
32. http://www.nanophase.com/applications/textile_fibers.asp
33. J.J. Stiglich, C.C. Yu, T.S. Sudarshan. *Int. Conf. Tungsten Refract. Met.* 3 (1995) 229.
34. C. Blasco, Y. Pico. *Trends Anal. Chem.*, 30 (2011) 84.
35. K. Tiede, A.B.A. Boxall, S.P. Tear, J. Lewis, H. David, M. Hassellv. *Food Additives and Contaminants*, 25 (2008) 795.
36. M.G. Valdes, A.C.V. Gonzalez, J.A.G. Calzon, M.E. Diaz-Garcia. *Microchim. Acta*, 166 (2009) 1.
37. D.A. Pereira de Abreu, P.P. Losada, I. Angulo, J.M. Cruz. *Eur. Polym. J.*, 43 (2007) 2229.
38. N. Sozer, J.L. Kokini. *Trends Biotechnol.*, 27 (2009) 82.
39. M. Siegrist, N. Stampfli, H. Kastenholz, C. Keller. *Appetite*, 51 (2008) 283.
40. ISI web of science <http://portal.isiknowledge.com/>
41. B.J. Marquis, S.A. Love, K.L. Braun, C.L. Haynes. *Analyst*, 134 (2009) 425.
42. K. Savolainen, H. Alenius, H. Norppa, L. Pylkkinen, T. Tuomi, G. Kasper. *Toxicology*, 269 (2010) 92.
43. S.T. Holgate. *J. Biomed. Nanotechnol.* 6 (2010) 1.
44. E. Casals, S. Vazquez-Campos, N.G. Bastus, V. Puentes. *Trends Anal. Chem.*, 27 (2008) 672.
45. K. Gerloff, I. Fenoglio, E. Carella, J. Kolling, C. Albrecht, A.W. Boots, I. Förster, R.P.F. Schins. *Chem. Res. Toxicol.*, 25 (2012) 646.
46. C.M. Sayes, R. Wahi, P.A. Kurian, Y. Liu, J.L. West, K.D. Ausman, D.B. Warheit, V.L. Colvin. *Toxicol. Sci.*, 92 (2005) 174.
47. A. Nel, T. Xia, L. Madler, N. Li. *Science*, 311(2006) 622.
48. J. Chan, T. Ying, Y.F. Guang, L.X. Lin, T. Kai, Z.Y. Fang, Y.X. Ting, L.F. Xing, Y.Y. Ji. *Biol. Trace Elem. Res.*, 144 (2011)183.
49. N. Singh, B. Manshian, G.J.S. Jenkins, S.M. Griffiths, P.M. Williams, T.G.G. Maffei, C.J. Wright, S.H. Doak. *Biomaterials*, 30 (2009) 3891.
50. N. Li, C. Sioutas, A. Cho, D. Schmitz, C. Misra, J. Sempf, M. Wang, T. Oberley, J. Froines, A. Nel. *Environ. Health Persp.*, 111 (2003) 455.
51. D.M. Brown, M.R. Wilson, W. MacNee, V. Stone, K. Donaldson. *Toxicol, Appl, Pharmacol.*, 175 (2001) 191.

52. S. Hasegawa, M. Hirabayashi, S. Kobayashi, Y. Moriguchi, Y. Kondo, K. Tanabe, S. Wakamatsu. *J. Environ. Sci. Health A.*, 39 (2004) 2671.
53. M. Geiser, B. Rothen-Rutishauser, N. Kapp, S. Schurch, W. Kreyling, H. Schulz, M. Semmler, V.I.Hof, J. Heyder, P. Gehr. *Environ. Health Perspect.*, 113 (2005) 1555.
54. M.W. Frampton, J.C. Stewart, G. Oberdorster, P.E. Morrow, D. Chalupa, A.P. Pietropaoli, L.M. Frasier, D.M. Speers, C. Cox, L.S. Huang. *Environ. Health Perspect.*, 114 (2006) 51.
55. S. Perez, M. Farre, D. Barcelo. *Trends Anal. Chem.*, 28 (2009) 820.
56. C.W. Isaacson, M. Kleber, J.A. Field. *Environ. Sci. Technol.*, 43 (2009) 6463.
57. C. Metcalfe, E. Bennett, M. Chappell, J. Steevens, M. Depledge, G. Goss, S. Goudey, S. Kaczmar, N. O'Brien, A. Picado, A.B. Ramadan. *NATO Sci. Peace Security*, 2 (2009) 95.
58. B.C. Englert. *J. Environ. Monit.*, 9 (2007) 1154.
59. M. Hasselov, J.W. Readman, J.F. Ranville, K. Tiede. *Ecotoxicology* 17 (2008) 344.
60. I. Linkov, F.K. Satterstrom, J. Steevens, E. Ferguson, R.C. Pleus. *J. Nanopart. Res.*, 9 (2007) 543.
61. K.N. Thakkar, S.S. Mhatre, R.Y. Parikh. *Nanotechnol. Bio. Med.* 6 (2010) 257.
62. H.E. Lenny, C.Winkel, A. Johnson, M. Lenz, T. Grundl, O.X. Leupin, M. Amini, L. Charlet. *Environ. Sci. Technol.*, 46 (2012) 571.
63. B. Huang, J. Zhang, J. Hou, C. Chen. *Free Radic. Biol. Med.*, 35 (2003) 805.
64. H. Wang, J. Zhang, H. Yu. *Free Radic. Biol. Med.*, 42 (2007) 1524.
65. J. Dobias, E.I Suvorova, R. Bernier-Latmani. *Nanotechnology*, 22 (2011) 195605.
66. J. Zhang, X. Wang, T. Xu, *Toxicol. Sci.*, 101 (2008) 22.
67. Y. Zhang, J. Wang, L. Zhang. *Langmuir*, 26 (2010) 17617.
68. T. Chen, Y. Wong, W. Zheng, Y. Bai, L. Huang. *Colloids Surf.*, 67 (2008) 26.
69. Y. Shen, X. Wang, A. Xie, L. Huang, J. Zhu, L. Chen. *Mater. Chem. Phys.*, 109 (2008) 534.
70. J.S. Zhang, X.Y. Gao, L.D. Zhang, Y.P. Bao. *Biofactors*, 15 (2001) 27.
71. S.V. Valueva, L.N. Borovikova, V.V. Koreneva, Ya.I. Nazarkina, A.I. Kipper, V.V. Kopeikin. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 81 (2007) 1170.
72. S. K. Mehta, S. Chaudhary, K.K. Bhasin. *J Nanopart. Res.*, 11 (2009) 1759.
73. S. Zheng, X. Li, Y. Zhang, Q. Xie, Y.S. Wong, W. Zheng, T. Chen. *International Journal of Nanomedicine*, 7 (2012) 3939.
74. X.Y. Gao, J.S. Zhang, L.D. Zhang. *Advanced Materials*, 14 (2002) 290.
75. H.Y.Wang, S.Y. Zhang, M.Z. Liu, H.W. Gao, Y.P. Tian. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 21 (2004) 788.
76. S.Y. Zhang, J. Zhang, H.Y.Wang, H.Y. Chen, *Materials Letters*, 58 (2004) 2590.
77. V.V. Kopeikin, S.V. Valueva, A.I. Kipper. *Polymer Science*, 45 (2003) 374.

78. Y. Bai, Y. Wang, Y. Zhou, W. Li, W. Zheng. *Materials Letters* 62 (2008) 2311.
79. S.L. Wang, H.H. Yao, L.L. Guo, L. Dong, S.G. Li, Y.P. Gu. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 190 (2009) 8.
80. A. Liu, W. Song, D. Cao, X. Liu, Y. Jia. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 30 (2008) 181.
81. Y. Luo, B. Zhang, W.H. Cheng, Q Wang. *Carbohydrate Polymer*, 82 (2010)942.
82. S.J. Fairweather-Tai. *Eur. J. Clinic. Nutr.*, 51S (1997) S20.
83. C. Ip, H.J. Thompson, Z. Zhu, H.E. Ganther. *Cancer Res.*, 60 (2000) 2882.
84. J. Lanfear, J. Fleming, L. Wu, G. Wester, P.R. Harrison. *Carcinogenesis*, 15 (1994) 1387.
85. D.G. Menter, A.L. Sabichi, S.M. Lippman. *Biomarkers & Prevention* 9 (2000) 1171.
86. P.D. Whanger. *Br. J. Nutr.*, 91 (2004) 11.
87. G.F. Combs. *J. Nutr.*, 135 (2005) 343.
88. R. Zhao, N. Xiang, E.F. Domann, W.X. Zhong. *Cancer Res.*, 66 (2006) 2296.
89. L. Kong, Q. Yuan, H. Zha, Y. Li, Q. Gu, Q. Wang, Xiaolin Bi, X. Gao. *Biomaterials*, 32 (2011) 6515.
90. H.J. Wang, P.Q. Zhao, X.F. Liang, X.Q. Gong, T. Song, R.F. Niu, J. Chang. *Biomaterials*, 31 (2010) 4129.
91. J. Pi, H. Jin, R.Y. Liu, B. Song, Q. Wu, L. Liu, J.H. Jiang, F.Yang, H.H. Cai, J. Cai. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97 (2013) 1051.
92. W. Liu, X. Li, Y.S. Wong, W. Zheng, Y. Zhang, W. Cao, T. Chen. *ACS Nano*, 6 (2012) 6578.
93. N. White, G. Burnstock. *Trends Pharmacol. Sci.*, 27(2006) 211.
94. D.S. Emmett, A. Feranchak, G. Kilic, L. Puljak, B Miller, S Dolovcak. *Hepatology* 47 (2008) 698.
95. V. Arjunan, S.J. Karpen, S. Thevananther. *Hepatology*, 36 (2002) 239A.
96. Y. Zhang, X. Li, Z. Huang, W. Zheng, C. Fan, T. Chen. *Nanomed. Nanotech., Biol., Med.*, 9 (2013) 74.
97. L. Tan, X. Jia, X.F. Jiang, Y.Y. Zhang, H. Tang, S.Z. Yao, Q. Xie. *Biosens. Bioelectron.*, 24 (2009) 2268.
98. K. Park, S. Lee, E.Kang, Kim, K. K. Choi, I.C. Kwon. *Adv. Funct. Mater.*, 19 (2009) 1553.
99. S. Cao, F. A. Durrani, Y.M. Rustum. *Clin. Cancer Res.*, 10 (2004) 2561.
100. H. Luoa, F.Wang, Y. Baia, T. Chena, W. Zheng. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94 (2012) 304.
101. M. Gallego-Gallegos, L.E. Doig, J.J. Tse, I.J. Pickering, K. Liber. *Environ. Sci. Technol.*, 47 (2013) 584.
102. H. Li, J. Zhang, T. Wang, W. Luo, Q. Zhou, G. Jiang. *Aquatic Toxicology* 89 (2008) 251.

103. E. Domokos-Szabolcsy, L. Marton, A. Sztrik, B. Babka, J. Prokisch, M. Fari. *Plant Growth Regul.*, 68 (2012) 525.
104. R.R. Mishra, S. Prajapati, J. Dasc. *Chemosphere*, 84 (2011) 1231.
105. P.R. Dowdie, R.S. Oremland. *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998) 3749.
106. N.A. Golubkina, G.E. Folmanis, I.G. Tananaev. *Biological Sciences*, 444 (2012) 176.
107. K.J. Dietz, S. Herth. *Trends Plant Sci.*, 16 (2011) 582.
108. V.N. Bogachev, L.V. Kovalenko, G.E. Folmanis. *Persp. Mater.*, 3 (2007) 37.
109. I.N. Nikonov, L.I. Ivanov, L.V. Kovalenko, G.E. Folmanis. *Persp. Mater.*, 4 (2009) 54.
110. J. Emsley. En: *Nature's Building Blocks. An A-Z Guide to the Elements*. N.J. Rud (Ed). Oxford University Press (2001).
111. D. Bersani, P.P. Lottici, X.Z. Ding. *Applied Physics Letters* 72 (1998) 73.
112. A.P. Popov, A.V. Priezhev, J. Lademann, R. Myllyla. *Journal of Physics D: Applied Physics* 38 (2005) 2564.
113. A. Agrawal, J. Cizeron, V.L. Colvin. *Microsc. Microanal.*, 4 (1998) 269.
114. L. Gao, Q. Zhang. *Scr. Mater.*, 44 (2001) 1195.
115. H. Zhang, J. F. Banfield. *J. Phys. Chem. B*, 104 (2000) 3481.
116. H. Zhang, J.F. Banfield. *J. Mater. Chem.* 8 (1998) 2073.
117. A. Fujishima, K. Honda. *Nature* 238 (1972) 37.
118. T. Paunesku, T. Rajh, G. Wiederrecht, J. Maser, S. Vogt, N. Stojicevic, M. Protic, B. Lai, J. Oryhon, M. Thurnauer, G. Woloschak. *Nat. Mater.*, 2 (2003) 343.
119. T. Tachikawa, S. Tojo, M. Fujitsuka, T. Majima, *Langmuir*, 20 (2004) 2753.
120. B. Oregan, M. Gratzel. *Nature*, 353 (1991) 737.
121. H. Zhang, B. Chen, J.F. Banfield. *Physical Review B*, 78 (2008) 214106.
122. N. Sadrieh, A.M. Wokovich, N.V. Gopee, J. Zheng, D. Haines, D. Parmiter, P.H. Siitonen, C.R. Cozart, A.K. Patri, S.E. McNeil, P.C. Howard, W.H. Doub, L.F. Buhse. *Toxicol. Sci.* 115 (2010) 156.
123. A.P. Popov, S. Haag, M. Meinke, J. Lademann, A. Priezhev, R. Myllyla. *J. Biomed. Opt.*, 2 (2009) 14.
124. R.M. Brand, L. McMahon, J.L. Jendrzewski, A.R. Charron. *Food Chem. Toxicol.*, 45 (2007) 93.
125. A.O. Gamer, E. Leibold, B. van Ravenzwaay. *Toxicol. In Vitro*, 20 (2006) 301.
126. <http://www.icta.org/doc/Nano%20FDA%20petition%20final.pdf>.
127. A.S. Barnard, P. Zapol, L.A. Curtiss. *Surface Science*, 582 (2005) 173.
128. X. Chen, S.S. Mao. *Chem. Rev.*, 107 (2007) 2891.
129. E. Scolan, C. Sanchez. *Chem. Mater.*, 10 (1998) 3217.
130. H.J. Chen, L. Wang, W.Y. Chiu. *Mater. Chem. Phys.*, 101 (2007) 12.

131. J. Beusen, M.K Van Bael, H. Van den Rut, J.D. Haen, J. Mullens. *J. Eur. Ceram. Soc.*, 27 4529 (2007).
132. J. Yu, J.C. Yu, W. Ho, M.K.P Leung, B. Cheng, G. Zhang, X. Zhao. *Appl. Catal., A: General* 255 309 (2003).
133. S. Mahshid, M. Askari, M.S Ghamsari. *J. Mater. Process. Technol.*, 189 (2007)296.
134. C.A. Martinez-Perez, P.E Garcia-Casillas, H. Camacho-Montes, H.A. Monreal-Romero, A. Martinez-Villafane, J. Chacon-Nava. *J. Alloys Compd.*, 820 (2007) 434.
135. D. Liao, B. Liao. *Int. J. Chem. Reactor Eng.*, 5 (2007) A24.
136. D. Zhang, L. Qi, J. Ma, H. Cheng *J. Mater. Chem.* 12 (2002) 3677.
137. Y. Zhang, G. Xiong, N. Yao, W. Yang, X. Fu. *Catal. Today*, 68 (2001) 89.
138. Q. Zhang, L. Gao, J. Guo. *J. Eur. Ceram. Soc.*, 20 (2000) 2153.
139. R. Chu, J. Yan, S. Lian, Y. Wang, F. Yan, D. Chen. *Solid State Commun.*, 130 (2004) 789.
140. H. Moeckel, M. Giersig, F. Willig. *J. Mater. Chem.*, 9 (1999) 3051.
141. US P. 4692273 (1987)
142. S. Baskaran, L. Song, J. Liu, Y.I. Chen, G.L. Graff. *J. Am. Ceram. Soc.* 81 (1998) 401.
143. M.H Habibi, M. Nasr-Esfahani. *Dyes Pigm.*, 75 (2007) 714.
144. R.H. Müller. En: *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis* (1996).
145. P. Bihari, M.Vippola, St. Schultes, M. Praetner, A.G Khandoga, C.A Reichel, C. Coester, T. Tuomi, M. Rehberg, F. Krombach. *Part. Fibre Toxicol.*, 5 (2008) 14.
146. Z.R. Ismagilov, L.T. Tsykoza, N.V. Shikina, V.F. Zarytova, V.V. Zinoviev, S.N. Zagrebelnyi. *Russian Chemical Reviews*, 78 (2009) 942.
147. J. Moser, S.Punchihewa, P.P. Infelta, M. Gratzel, *Langmuir*, 7 (1991) 3012.
148. I.A. Mudunkotuwa, V.H. Grassian. *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 14986.
149. S. Deguchi, T. Yamazaki, S.A. Mukai, R. Usami, K. Horikoshi. *Chem. Res. Toxicol.*, 20 (2007) 854.
150. R.C. Murdock, L. Braydich-Stolle, A.M. Schrand, J.J. Schlager, S.M. Hussain. *Toxicol. Sci.*, 101 (2008) 239.
151. M.C. Buford, R.F. Hamilto, A. Holian. *Part. Fibre Toxicol.*, 4 (2007) 6.
152. R.F. Domingos, N. Tufenkji, K.J. Wilkinson. *Environ. Sci. Techn.*, 43 (2009) 1282.
153. G.J. Fleming, H. Idriss. *Langmuir*, 20 (2004) 7540.
154. B. Boddenberg, K. Eltzner. *Langmuir*, 7 (1991) 1498.
155. H.R. Goncalves, W. Herwig Schreiner, E.R. Leite. *Langmuir*, 26 (2010) 11657.
156. J. Kurepa, T. Paunesku, S. Vogt, H. Arora, B.M. Rabatic, J. Lu, M.B. Wanzer, G.E. Woloschak, J.A. Smalle. *Nano Lett.*, 10 (2010) 2296.
157. Y. Kawanaka, K. Sakamoto, N. Wang, S.J. Yun. *J. Chromatogr. A*, 1163 (2007) 312.

158. T. Amano, T. Toyooka, Y. Ibuki. *Sci. Total Environ.*, 408 (2010) 480.
159. N. Li. *Nanoscale Res. Lett.*, 5 (2010) 108.
160. Z.E. Allouni, P.J. Hø, M.A. Cauqui, N.R. Gjerdet, M.R. Cimpan. *Toxicology in Vitro*, 26 (2012) 469.
161. K. Hirakawa, M. Mori, M. Yoshida, S. Oikawa, S. Kawanishi. *Free Radic. Res.*, 38 (2004) 439.
162. L.P. Sychevaa, V.S. Zhurkova, V.V. Iurchenkoa, N.O. Dauge-Daugeb, M.A. Kovalenkoa, E.K. Krivtsovaa, A.D. Durnev. *Mutation Research*, 726 (2011) 8.
163. X. Hana, N. Corsona, P. Wade-Mercera, R. Geleina, Ji. Jiangc, M. Sahud, P. Biswasd, J.N. Finkelsteinb, A. Eldera, G. Oberdörster. *Toxicology*, 297 (2012) 1.
164. G.J. Nohynek, E.K. Dufour. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 21 (2008) 136.
165. T. Pinheiro, J. Allon, L.C. Alves, P. Filipe, J.N. Silva. *Phys. Res. B*, 260 (2007) 119.
166. P. Filipe, J.N. Silva, R. Silva, J.L. Cirne de Castro, M. Marques Gomes, L.C. Alves, R. Santus, T. Pinheiro. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 22 (2009) 266.
167. K. Schilling, B. Bradford, D. Castelli, E. Dufour, J.F. Nash, W. Pape, S. Schulte, I. Tooley, J. van den Bosch, F. Schellauf. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 9 (2010) 495.
168. J. Schulz, H. Hohenberg, F. Pflucker, E. Gartner, T. Will, S. Pfeiffer, R. Wepf, V. Wendel, H. Gers-Barlag, K.P. Wittern. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54 (2002) S157.
169. C. Bennat, C.C. Muller-Goymann. *Int. J. Cosmetic Sci.*, 22 (2000) 271.
170. M. Senzui, T. Tamura, K. Miura, Y. Ikarashi, Y. Watanabe, M. Fujii. *J. Toxicol. Sci.*, 35 (2010) 107.
171. L. Clément, C. Hurel, N. Marmier. *Chemosphere*, 90 (2013) 1083.
172. D. Drobne, A. Jemec, Z. Pipan Tkalec. *Environ. Poll.*, 157 (2009) 1157.
173. H. Czili, A. Horvath. *Applied Catalysis B-Environmental*, 81 (2008) 295.
174. I.K. Konstantinou, T.A. Albanis. *Applied Catalysis B-Environmental*, 49 (2004) 1.
175. A.L. Linsebigler, G.Q. Lu, J.T. Yates. *Chemical Reviews*, 95 (1995) 735.
176. R.J. Miller, S. Bennett, A.A. Keller, S. Pease, H.S. Lenihan. *PLoS ONE*, 7 (2012) e30321.
177. M. Fouqueray, B. Dufils, B. Vollat, P. Chaurand, C. Botta, K. Abacci, J. Labille, J. Rose, J. Garric. *Environ. Poll.* 163 (2012) 55.
178. J. Lu,; L. Luo,; S. Zhang,; K. Yang, The uptake and accumulation of TiO₂ nanoparticles by maize plants. *Environ. Chem.*, 30 (2011) 903.
179. C. Larue, J. Laurette, N. Herlin-Boime, H. Khodja, B. Fayard, A.M. Flank, F. Brisset, M. Carriere. *Sci. Total Environ.*, 431 (2012) 197.
180. A.D. Servin, H. Castillo-Michel, J.A. Hernandez-Viezcas, B. Corral Diaz, J.R. Peralta-Videa, J.L. Gardea-Torresdey. *Environ. Sci. Technol.*, 46 (2012) 7637.

181. M. Farre, J. Sanchis, D.Barcelo. *Trends Anal. Chem.*, 30 (2011) 517.
182. D. Mavrocordatos, W. Pronk, M. Boller. *Water Sci. Technol.*, 50 (2004) 9.
183. K. Tiede, S.P. Tear, H. David, A.B.A. Boxall. *Water Res.*, 43 (2009) 3335.
184. V. Prasad, D. Semwogerere, E.R. Weeks. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 19 (2007) 1355.
185. J.T. Nurmi, P.G. Tratnyek, V. Sarathy, D.R. Baer, J.E. Amonette, K. Pecher, C.M. Wang, J.C. Linehan, D.W. Matson, R.L. Penn. *Environ. Sci. Technol.*, 39 (2005) 1221.
186. C.Y. Wang, C. Bottcher, D.W. Bahnemann, J.K. Dohrmann. *J. Nanoparticle Res.*, 6 (2004) 119.
187. V. Rabolli, L.C.J. Thomassen, F. Uwambayinema, J.A. Martens, D. Lison. *Toxicol. Lett.*, 206 (2011) 197.
188. S.Y. Choi, S. Jeong, S.H. Jang, J. Park, J.H. Park, K.S. Ock, S.Y. Lee, S.W. Joo. *Toxicol. Vitro* 26 (2012) 229.
189. S. Dubascoux, F. Von Der Kammer, I. Le Hécho, M. Potin Gautier, G. Lespes. *J. Chromatogr. A*, 1206 (2008) 160.
190. E.C. Jung, H.R. Cho, K.K. Park, J.W. Yeon, K. Song. *Appl. Phys. B*, 97 (2009) 867.
191. C. Latkoczy, R. Kagi, M. Fierz, M. Ritzmann, D. Günther, M. Boller. *J. Environ. Monit.* 12 (2010) 1422.
192. B. Suarez, Y. Moliner-Martinez, S. Cardenas, B.M. Simonet, M. Valcarcel. *Environ. Sci. Technol.*, 42 (2008) 6100.
193. J. Jiang, G. Oberdorster, P. Biswas. *J. Nanopart. Res.*, 11 (2009) 77.
194. P. Krystek, A. Ulrich, C.C. Garcia, S. Manohard, R. Ritsema. *J. Anal. At. Spectrom.*, 26 (2011) 1701.
195. L.J. Gimbert, P.M. Haygarth, R. Beckett, P.J. Worsfold. *Environ. Chem.*, 3 (2006) 184.
196. ISO/TS-10867-2010, ISO Technical Specification (2010).
197. Prospect, Guidelines and Protocols for Sampling, Prospect Publication—Ecotoxicology Test Protocols for Representative Nanomaterials in Support of the OECD Sponsorship Programme (2010).
198. Prospect, Protocol for Nanoparticle Dispersion, Prospect Publication—Ecotoxicology Test Protocols for Representative Nanomaterials in Support of the OECD Sponsorship Programme (2010).
199. S.A. Darke, S.E. Long, C.J. Pickford, J.F. Tyson, Fresenius *J. Anal. Chem.*, 337 (1990) 284.
200. R. Allabashi, W. Stach, A. de la Escosura-Muniz, L. Liste-Calleja, A. Merkoci. *J. Nanopart. Res.*, 11 (2009) 2003.
201. A. Scheffer, C. Engelhard, M. Sperling, W. Buscher. *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 249.

202. W. Zhang, Y. Ji, J. Meng, X. Wu, H. Xu. PLoS ONE, 7 (2012) e31957.
203. A. Sarmiento-Gonzalez, J.R. Encinar, J.M. Marchante-Gayon, A. Sanz-Medel. Anal. Bioanal. Chem., 393 (2009) 335.
204. D.A. Navarro, M.A. Bisson, D.S. Aga. J. Hazard. Mater, 427 (2012) 211.
205. J.L. Tang, L. Xiong, S. Wang, J.Y. Wang, L. Liu, J. Li, F.Q. Yuan, T.F. Xi. J. Nanosci. Nanotechnol., 9 (2009) 4924.
206. M.M. Song, W.J. Song, H. Bi, J. Wang, W.L. Wu, J. Sun, M. Yu. Biomaterials, 31 (2010) 1509.
207. Y. Hayashi, P. Engelmann, R. Foldbjerg, M. Szabo, I. Somogyi, E. Pollak, L. Molnar, H. Atrup, D.S. Sutherland, J. Scott-Fordsmand, L.H. Heckmann. Environ. Sci. Technol., 46 (2012) 4166.
208. M.C. Wende, J.A.C. Broekaert. Fresenius J. Anal. Chem., 370 (2001) 513.
209. M. Resano, F. Vanhaecke, M.T.C. de Loos-Vollebregt. J. Anal. At. Spectrom., 23 (2008) 1450.
210. J.R. Lead, K.J. Wilkinson. Environ Chem., 3 (2006) 159.
211. W. Heilen, Silicone Resins and their Combinations, Vincentz Network Publishing, Hannover (2005).
212. L.J. Gimbert, P.M. Haygarth, R. Beckett, P.J. Worsfold. Environ. Sci. Technol., 39 (2005) 1731.
213. F. Liu. J. Chromatogr., A, 1216 (2009) 9034.
214. K. Teide, A.B.A. Boxall, X. Wang, D. Gore, D. Tiede, M. Baxter, H. David, S.P. Tear, J. Lewis. J. Anal. At. Spectrom., 25 (2010) 1149.
215. A. Helfrich, W. Bruchert, J. Bettmer. J. Anal. Atom. Spectrom., 21 (2006) 431.
216. G.A. Craig, P.J. Allen, M.D. Mason. Methods Mol. Biol., 624 (2010) 177.
217. K.M. Krueger, A.M. Al-Somali, J.C. Falkner, V.L. Colvin. Anal. Chem., 77 (2005) 3511.
218. K.J. Ziegler, D.J. Schmidt, U. Rauwald, K.N. Shah, E.L. Flor, R.H. Hauge, R.E. Smalley. Nano Lett. 5 (2005) 2355.
219. E. Chmela, R. Tjissen, M.T. Blom, H.J.G.E. Gardeniers, A. Van den Berg. Anal. Chem., 74 (2002) 3470.
220. U. Pyell. Electrophoresis, 31 (2010) 814.
221. W.M. Hwang, C.Y. Lee, D.W. Boo, J.G. Choi. Bull. Korean Chem. Soc., 24 (2003) 684.
222. S. Dubascoux, I. Le Hecho, M. Hasselov, F. Von Der Kammer, M. Potin Gautier and G. Lespes. J. Anal. At. Spectrom., 25 (2010) 613.
223. J.J. Kirkland, W.W. Yau, W.A. Doerner, J.W. Grant. Anal. Chem., 52 (1980) 1944.
224. C.M. Keary, D. Shephard. US Pat. 4657676, 4 (1987) 657.

225. T. Chianea, N.E. Assidjo, P.J.P. Cardot. *Talanta*, 51 (2000) 835.
226. D.J. Chittleborough, D.M. Hotchin, R. Beckett. *Soil Sci.*, 153 (1992) 341.
227. A. Samontha, J. Shiowatana, A. Siripinyanond. *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (2011) 973.
228. J.R. Silveira, G.J. Raymond, A.G. Hughson, R.E. Race, V.L. Sim, S.F. Hayes, B. Caughey. *Nature*, 437 (2005) 257.
229. J. Liu, J. Andya, S. Shire. *AAPS J.*, 8 (2006) E580.
230. S.K. Ratanathanawong, S. Williams, D. Lee. *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 1720.
231. H. Lee, S.K.R. Williams, S.D. Allison, T.J. Anchordoquy. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 837.
232. B. Wittgren, K.G. Wahlund. *J. Chromatogr., A*, 760 (1997) 205.
233. <http://meetings.aps.org/link/BAPS.2009.MAR.D24.7>
234. *Field Flow Fractionation Handbook*. M.E. Schimpf, K.D. Caldwell, J.C. Giddings (Ed.) Wiley Interscience, New York (2000).
235. N.M. Thang, H. Geckeis, J.I. Kim, H.P. Beck. *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 181 (2001) 289.
236. S. Dubascoux, F. Von Der Kammer, I. Le Hécho, M. Potin Gautier, G. Lespes. *J. Chromatogr. A*, 1206 (2008) 160.
237. R.N. Qureshi, W.T. Kok. *LC–GC Europe*, 23 (2010) 18.
238. H.E. Pace, E.K. Leshner, J.F. Ranville. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29 (2010) 1338.
239. A. Ulrich, S. Losert, N. Bendixen, A. Al-Kattan, H. Hagendorfer, B. Nowack, C. Adlhart, J. Ebert, M. Lattuada, K. Hungerbühler. *J. Anal. At. Spectrom.*, 27 (2012) 1120.
240. S. Gschwind, L. Flamigni, J. Koch, O. Borovinskaya, S. Groh, K. Niemax, D. Gunther. *J. Anal. At. Spectrom.*, 26 (2011) 1166.
241. F. Laborda, J. Jimenez-Lamana, E. Bolea, J. R. Castillo. *J. Anal. At. Spectrom.*, 26 (2011), 1362.
242. C. Degueldre, P.Y. Favarger, C. Bitea. *Anal. Chim. Acta*, 518 (2004) 137.
243. C. Degueldre, P. Y. Favarger. *Talanta*, 62 (2004) 1051.
244. C. Degueldre, P.Y. Favarger, S. Wold. *Anal. Chim. Acta*, 555 (2006) 263.
245. M. Shen, H. Cai, X. Wang, X. Cao, K. Li, S.H. Wang, R. Guo, L. Zheng, G. Zhang, X. Shi. *Nanotechnology*, 23 (2012) 105601.
246. C. Uboldi, G. Giudetti, F. Broggi, D. Gilliland, J. Ponti, F. Rossi. *Mutat. Res.*, 745 (2012) 11.
247. J.H. Yuan, Y. Chen, H.-X. Zha, L.J. Song, C.-Y. Li, J.Q. Li, X.H. Xia. *Colloids Surf. B*, 76 (2010) 145.
248. V. Christen, K. Fent. *Chemosphere*, 87 (2012) 423.
249. H.A. Ngwa, A. Kanthasamy, Y. Gu, N. Fang, V. Anantharam, A.G. Kanthasamy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 256 (2011) 227.

250. J.J. Li, D. Hartono, C.N. Omg, B.H. Bay, L.Y.L. Yung. *Biomaterials*, 31 (2010) 5996.
251. M. Konczol, S. Ebeling, E. Goldenberg, F. Treude, R. Gminski, R. Giere, B. Grobety, B. Rothen-Rutishauser, I. Merfort, V. Mersch-Sundermann. *Chem. Res. Toxicol.*, 24 (2011) 1460.
252. I. Passagne, M. Morille, M. Rousset, I. Pujalte, B.L. Azou. *Toxicology*, 299 (2012) 112.
253. C. Harris, J.M. Hansen. *Methods Mol. Biol.*, 889 (2012) 325.
254. S.G. Mukherjee, N. O'Clonadh, A. Casey, G. Chambers. *Toxicol. Vitro*, 26 (2012) 238.
255. A. Oukarroum, S. Bras, F. Perreault, R. Popovic. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 78 (2012) 80.
256. F. Stanley Rosarin, V. Arulmozhi, S. Nagarajan, S. Mirunalini. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2 (2012) 1.
257. M. Sharma, R.L. Salisbury, E.I. Maurer, S.M. Hussaina, C.E.W. Sulentic. *Nanoscale*, 5 (2013) 3747.
258. S.M. Hussain, K.L. Hess, J.M. Geahart, K.T. Geiss, J.J. Schlager. *Toxicol. Vitro*, 19 (2005) 975.
259. J.G. Teeguarden, P.M. Hinderliter, G. Orr, B.D. Thrall, J.G. Pounds. *Toxicol. Sci.*, 95 (2007) 300.
260. G.D. Zhang, Z. Yang, W. Lu, R. Zhang, Q. Huang, M. Tian, L. Li, D. Liang, C. Li. *Biomaterials* 30 (2009) 1928.
261. J.H. Park, J. Park, U. Dembereldorj, K. Cho, K. Lee, S.I. Yang, S.Y. ee, S.W. Joo. *Anal. Bioanal. Chem.*, 401 (2011) 1631.
262. V. Christen, K. Fent. *Chemosphere*, 87 (2012) 423.
263. M. Al-Rawi, S. Diabate, C. Weiss. *Arch. Toxicol.*, 85 (2011) 813.
264. H.E. Pace, E.K. Leshner, J.F. Ranville. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29 (2010) 1338.
265. F. Watari, N. Takashi, A. Yokoyama, M. Uo, T. Akaska, Y. Sato, S. Abe, Y. Totsuka, K. Tohij, J.R. Soc, *Interface* 6 (2009) S371.
266. P. Fouchet, C. Jayat, Y. Héchard, M.H. Ratinaud, G. Frelat. *Biology of the Cell*, 78 (1993) 95.
267. J.A. Kim, C. Aberg, A. Salvati, K.A. Dawson. *Nature Nanotech.*, 7 (2012) 779.
268. P.V. AshaRani, G.L. Kah Mun, M. Prakash Hande, S. Valiyaveetil. *ACS nano*, 3 (2009) 279.
269. J. Ahmad, M. Ahamed, M.J. Akhtar, S.A. Alrokayan, M.A. Siddiqui, J. Musarrat, A.A. Al-Khedhairi. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 259 (2012) 160.
270. V. Sharma, D. Anderson, A. Dhawan. *Apoptosis*, 17 (2012) 852.
271. T. Chen, Y.S. Wong, W. Zheng, Y. Bai, L. Huang. *Coll. Surf. B*, 67 (2008) 26.
272. H. Luo, F. Wang, Y. Bai, T. Chen, W. Zheng, *Coll. Surf. B*, 94 (2012) 304.
273. J.L. Luque-Garcia, R. Sanchez-Diaz, I. Lopez-Heras, P. Martin, C. Camara. *Trends Anal. Chem.*, 43 (2013) 254.

274. G.L. Corthals, K. Rose En: Proteome research: New frontiers in functional genomics. Quantitation in proteomics Wilkins. Springer-Verlag (2007).
275. M.B. Goshe, R.D. Smith, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14 (2003) 101.
276. S.E. Ong, M. Mann. *Nat. Chem. Biol.*, 1 (2005)252.
277. H. Langen, M. Fountoulakis, S. Evers, B. Wipf, P. Berndt. En: 15N and 13C labeling of cells for identification and quantification of proteins on 2D gels. In Proceedings from the 3rd Siena 2-D Electrophoresis Meeting; Siena, Italy. D.F. Hochstrasser, L. Bini, V. Pallini (Ed) (1998).
278. Y. Oda, K. Huang, F.R. Cross, D. Cowburn, B.T. Chait. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96 (1999) 6591.
279. S.E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann. *Mol. Cell. Proteomics*, 1 (2002) 376.
280. S.E. Ong, M. Mann. *Nat. Protoc*, 1 (2006) 2650.
281. S. Gharbi, P. Gaffney, A. Yang, M.J. Zvelebil, R. Cramer, M.D. Waterfield, J.F. Timms. *Mol. Cell. Proteomics*, 1 (2002) 91.
282. S. Beranova-Giorgianni. *Trends Anal. Chem.*,22 (2003) 273.
283. B. Domon, R. Aebersold. *Science*, 312 (2006) 212.
284. W.J. Griffiths, A.P. Jonsson, S. Liu , D.K. Rai, Y. Wang. *Journal Biochemistry*, 355 (2001) 545.
285. J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M Whitehouse. *Science*, 246 (1989) 64.
286. H. Baharvan, A. Fathi, D. Van Hoff, G.H. Salekdeh. *Stem Cells*, 25 (2007) 1888.
287. K.G. Standing. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13 (2003) 595.
288. P. Hernandez, M. Muller, R.D. Appel. *Mass Spectrom. Rev.*, 25 (2006) 235.
289. D.N. Perkins, D.J. Pappin, D.M. Creasy, J.S. Cottrell. *Electrophoresis*, 20 (1999) 3551.

**Biotransformación, Acumulación y Toxicidad de Especies de Selenio.
Caracterización de Nanopartículas.**

OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Los objetivos principales de la investigación recogida en la presente memoria están orientados al estudio de los procesos de bioacumulación y biotransformación de Se en muestras biológicas, así como a la evaluación de los efectos biológicos de una especie de Se “especial”, como es el Se en forma de NPs. Continuando en la línea de las NPs, y debido al rápido crecimiento de esta área de investigación en los últimos años, otra de las finalidades marcadas a lo largo de esta investigación ha sido el desarrollo de un método para la determinación de NPs en productos de consumo humano. En concreto para la cuantificación de NPs de TiO₂, actualmente muy utilizadas en la industria cosmética.

A continuación se detallan los objetivos establecidos:

1. Estudio de la biofortificación agronómica con Se de las especies *Brassica rapa* y *Brassica napus* (dos variedades de colza) con el fin de aumentar las propiedades nutricionales de la fracción proteica de sus semillas, fuente de alimentación muy utilizada en la dieta de ganado bovino. Este objetivo responde a la necesidad de aumentar el nivel de Se en productos vegetales destinados al consumo humano y animal. En su consecución ha sido necesario:

- 1.1. Evaluación del potencial de las especies *Brassica* para asimilar y biotransformar Se en sus semillas.
- 1.2. Estudio del efecto de la biofortificación en el crecimiento de las plantas y formación de biomasa.
- 1.3. Discusión de los posibles mecanismos de detoxificación de las plantas tras la biofortificación con Se.

2. Determinación de los niveles de Se, Hg, y As en la especie *Clarias gariepinus* (pez gato), consecuencia de un posible problema de contaminación medio ambiental. Esta especie, es uno de los pescados más consumidos por la población de la ciudad de Sagua la Grande (Cuba). En concreto, la determinación del nivel de Se fue determinante, ya que el intervalo a partir del cual pasa de ser esencial a tóxico es muy estrecho.

3. Identificación y cuantificación de los selenocompuestos presentes en *Clarias gariepinus*.

Debido a las elevadas concentraciones de Se encontradas durante el desarrollo del objetivo anterior, se consideró esencial evaluar los posibles riesgos asociados a la consumición de esta especie. En este sentido, fue necesario:

3.1. Optimizar una extracción cuantitativa de especies de Se basándonos en el empleo de la hidrólisis enzimática y diferentes metodologías analíticas (extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonidos e incubación).

3.2. Llevar a cabo una cuantificación precisa de los compuestos orgánicos de Se mediante el empleo de (ID) LC-IPC-MS.

4. Validación de los resultados obtenidos de los estudios de especiación de Se mediante el empleo de: diferentes técnicas y metodologías analíticas basadas en protocolos de extracción enzimática y LC-ICP-MS, varios mecanismos de separación cromatográficos, y materiales de referencia certificados.

5. Evaluación de los efectos biológicos desencadenados tras la interacción entre las NPs de Se y células de hepatocarcinoma humano (HepG2). La esencialidad del Se debido a sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas ha sido demostrada en numerosas ocasiones. Sin embargo, se conoce muy poco sobre las propiedades que presenta este elemento cuando se encuentra en forma de NPs. Debido a esto, se ha considerado interesante profundizar en la interacción entre las NPs de Se y las células. Dentro de este trabajo, los objetivos más concretos han sido:

5.1. Estudio de la viabilidad y proliferación celular tras la exposición a las NPs.

5.2. Visualización de la localización de las NPs en el interior celular.

5.3. Identificación de las proteínas involucradas en la interacción NPs-células mediante la aplicación de una estrategia de proteómica cuantitativa basada en el marcaje isotópico estable de aminoácidos en cultivo celular (SILAC) y la espectrometría de masas (ESI-MS/MS).

6. Caracterización y cuantificación de NPs de TiO₂ presentes en productos cosméticos mediante el desarrollo de una metodología analítica basada en AF-FFF-UV/ICP-MS.

6.1. Discusión de las posibilidades y dificultades relacionadas con el uso de la técnica de separación AF-FFF para la cuantificación de NPs. Optimización de parámetros experimentales e instrumentales.

6.2. Desarrollo de un método de calibración “*online*” empleando estándar de naturaleza química similar.

7. Paralelamente a los diferentes trabajos de investigación plasmados en esta memoria, uno de los objetivos más importantes ha sido **la formación profesional y personal continuada mediante la realización de otras actividades científicas** que se recogen a continuación:

7.1. Realización de revisiones bibliográficas enfocadas a profundizar en el estudio de las selenoproteínas, y en las diferentes estrategias (bio)analíticas empleadas para evaluar el impacto de las NPs en la salud humana y medio ambiente.

7.2. Supervisión de la investigación de estudiantes y participación de forma activa en actividades docentes.

7.3. Desarrollo de trabajos de investigación complementarios (metodologías analíticas para la determinación de elementos traza) y colaboraciones con la industria.

7.4. Presentación de 13 comunicaciones orales y en cartel en congresos nacionales e internacionales.

7.5. Realización de 9 artículos publicados o en fase de publicación.

**Biotransformación, Acumulación y Toxicidad de Especies de Selenio.
Caracterización de Nanopartículas.**

PARTE EXPERIMENTAL

Capítulo I. Estudios de Bioacumulación y Biotransformación de Selenio en Plantas

El Selenio se considera un micronutriente esencial para humanos y animales, debido principalmente a sus propiedades antioxidantes y a otras funciones biológicas desempeñadas por las selenoproteínas. Este elemento se incorpora a la cadena alimenticia a través de cultivos vegetales, en los que sus niveles dependen en gran medida de su concentración en el suelo. En muchos países, se ha aumentado la concentración de Se en productos vegetales destinados al consumo humano y animal mediante la biofortificación de cultivos.

La capacidad de ciertas plantas para acumular y metabolizar el Se inorgánico a formas orgánicas depende de la biodisponibilidad de éste en el suelo y varía en función de la especie. La familia de las *Brassica* son consideradas plantas acumuladoras de Se, y por lo tanto muy adecuadas para llevar a cabo procesos de biofortificación. La especie *Brassica napus* (*B. napus*) ha sido utilizada en la fitoremediación de suelos, y su parte aérea, con un elevado contenido de Se, ha formado parte de la dieta alimenticia de ganado bovino y ovino. Sin embargo, el potencial de estas especies para asimilar y biotransformar Se en sus semillas se ha estudiado en menor extensión.

Los trabajos de investigación que se presentan en este capítulo son el resultado de una estrecha colaboración entre el Departamento de Biología Aplicada de la Universidad de Helsinki y el Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid. La finalidad de estos estudios ha sido el desarrollo de programas de biofortificación de Se en cultivos de *B. rapa* y *B. napus*, dos variedades de colza, cuyas semillas se utilizan en la alimentación ganado bovino y ovino. El primer trabajo (**“Agronomic biofortification of Brassica with selenium—enrichment of SeMet and its identification in Brassica seeds and meal”**). *Plant and Soil*, 337 (2010) 273 se ha centrado en investigar la eficacia de diferentes procesos de biofortificación (adicionando Se al suelo de cultivo o mediante aplicación foliar) evaluando la capacidad de las especies de *Brassica* para bioacumular y biotransformar Se. Todos los análisis se llevaron a cabo en la fracción proteica de las semillas, denominada harina de colza desgrasada (HCD), ya que suele ser incorporada a la dieta de los rumiantes.

Mediante el empleo de una hidrólisis enzimática y posterior análisis de los extractos por LC-ICP-MS se ha podido constatar que ambas especies de *Brassica* son capaces de bioacumular elevadas cantidades de selenio en la HCD, encontrándose que más de un 85% es biotransformado a SeMet. La eficiencia de extracción, en términos de cuantificación y estabilidad de especies, se evaluó empleando diferentes metodologías analíticas (incubación a

temperatura controlada vs empleo de la energía de ultrasonidos (baño y sonda)). Del mismo modo, el uso diferentes mecanismos de separación cromatográficos permitieron la correcta identificación de las especies. Paralelamente, también se estudiaron los efectos del Se en el crecimiento y formación de biomasa. Los resultados obtenidos de este estudio demuestran que la biofortificación de las especies de *Brassica* aumenta su valor nutricional debido a su elevada capacidad de biotransformación por parte de las plantas.

Nuestro estudio apoya el hecho de que las especies de *Brassica* son capaces de acumular altos niveles de selenio sin mostrar síntomas de toxicidad. La razón de esto es principalmente debida a que las especies tolerantes a Se presentan mecanismos para metilar los compuestos SeCys y SeMet, y transformarlos en aminoácido no proteicos como la SeMeSeCys. Los estudios llevados a cabo en el segundo trabajo ("**The dynamics of selenium uptake and metabolism of organic selenium species in the leaves and seeds of *Brassica napus* L.**". Plant Physiology (Enviado)) se han focalizado en investigar las dinámicas de asimilación de Se y síntesis de compuestos orgánicos en la parte aérea y semillas de la especie *B. napus* previamente biofortificadas. Los resultados obtenidos nos han permitido profundizar en los mecanismos de detoxificación de esta especie.

En las plantas, el Se inorgánico se transforma en Se orgánico mediante el mecanismo de asimilación del azufre, en el que están involucradas varias enzimas. En las plantas hiperacumuladoras, se ha observado que la selenocisteina metiltransferasa (SMT) es la enzima responsable para la metilación de la SeMet y SeCys a SeMeSeCys. Los bajos o imperceptibles niveles de SeMeSeCys detectados en la parte aérea y semillas de *B. napus* se debieron a falta de actividad de esta enzima. El análisis de una secuencia proteica de la SMT reveló la presencia del aminoácido treonina (Thr) en el lugar del aminoácido alanina (Ala)-184. Esta sustitución es típica de plantas no acumuladoras, incapaces de metilar la SeCys, y por lo tanto la responsable de los bajos niveles de SeMeSeCys encontrados en *B. napus*. Este hecho sugiere la existencia de un mecanismo de detoxificación alternativo.

I.1. Biofortificación Agronómica de Brassica con Selenio. Suplementación de SeMet y su Identificación en Semillas y Harinas de Colza Desgrasadas de *Brassica*

“Agronomic biofortification of Brassica with selenium—enrichment of SeMet and its identification in Brassica seeds and meal”.

Plant and Soil, 337 (2010) 273.

Parte de este trabajo se presentó en:

“6th International Franco-Spanish Workshop on Bio-Inorganic Analytical Chemistry”. Pau, Francia, Septiembre 2010. Tipo de presentación: Comunicación oral.

Agronomic biofortification of *Brassica* with selenium—enrichment of SeMet and its identification in *Brassica* seeds and meal

Mervi M. Seppänen · Juha Kontturi ·
Isabel Lopez Heras · Yolanda Madrid ·
Carmen Cámara · Helinä Hartikainen

Received: 21 June 2010 / Accepted: 1 August 2010 / Published online: 14 August 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract Selenium (Se) is an essential micronutrient and is circulated to the food chain through crops. *Brassica* species are efficient in Se accumulation and thus, good species for Se biofortification purposes. The residual fraction obtained after oil processing of *Brassica* seeds, the meal, is an important protein source in animal diets and used in feed concentrates. The accumulation of soil or foliar applied Se in the seeds and meal of *Brassica napus* and *B. rapa* as well as its effects on growth and yield formation was studied in two field experiments. Also, a HPLC-ICP-MS based method for the identification and quantification of Se species in *Brassica* seeds and meal was

developed. Selenium application did not affect the yield or oil content. High accumulation of Se in the seeds and meal ($1.92\text{--}1.96\ \mu\text{g Se g}^{-1}$) was detected. Biotransformation of inorganic Se was evaluated by using HPLC-ICP-MS previous enzymatic hydrolysis for species extraction. The Se speciation studies showed that up to 85% of the total Se was SeMet whereas other Se-species were not detected. We conclude that the agronomic biofortification of *Brassica* species can improve the nutritive quality of the protein rich meal fraction as it contains significant amount of SeMet.

Keywords Biofortification · *Brassica napus* · *Brassica rapa* · Fertilization · Oil seed rape · Selenium · SeMet · Speciation · Turnip rape

Responsible Editor: Hans Lambers.

M. M. Seppänen (✉) · J. Kontturi
Department of Agricultural Sciences,
University of Helsinki,
P.O. Box 27, 00014 Helsinki, Finland
e-mail: mervi.seppanen@helsinki.fi

H. Hartikainen
Department of Food and Environmental Sciences,
University of Helsinki,
P.O. Box 27, 00014 Helsinki, Finland

I. L. Heras · Y. Madrid · C. Cámara
Departamento de Química Analítica,
Universidad Complutense de Madrid,
Avda Complutense s/n,
28040 Madrid, Spain

Introduction

Selenium (Se) is recognized as essential microelement for humans and animals, mainly due to its antioxidative properties and role in hormone balance (Schwartz and Foltz 1957; Flohe et al. 1973; Rotruck et al. 1973). Moreover, dietary Se concentrations that are either too low or too high can be lethal to humans and animals (Combs 2001). In plants, evidence of the beneficial effects of Se on plant growth and stress tolerance is increasing (Hartikainen 2005), but it has not been

recognized as an essential micronutrient. Selenium is mainly circulated to the food chain via crop plants and feed, the Se concentrations of which are dependent on the Se level of the soil. A sufficient content of Se in feed for livestock is 0.05–0.1 mgkg⁻¹ DM whereas a daily intake of 1 mgkg⁻¹ is toxic (Gissel-Nielsen 1998). In areas where the agricultural soils are low in Se, the daily intake of Se by humans is low, approximately 0.025 mgday⁻¹ (Hartikainen 2005). Agronomic biofortification has successfully increased the daily Se intake to 0.08 mgday⁻¹ in 2001 and elevated the blood serum Se level of Finns from the lowest in Europe (0.63–0.76 μmol L⁻¹) to an adequate level (1.2–1.4 μmol L⁻¹) (Hartikainen 2005).

The additional health benefits of Se, such as improved immune system and reduced cancer risk, require higher than the currently recommended daily intakes (Rayman 2008). To reduce the incidences of lung, prostate and colo-rectal cancers in humans, a high Se concentration (200 μgday⁻¹) in diet is required (Combs 2001). Selenium can be supplied to the food chain in either inorganic or organic forms. The organic forms of Se are safer, their LD₅₀ values to rats being approximately 40 mgkg⁻¹, whereas that of inorganic sodium selenate is close to 15 mgkg⁻¹ (Rayman 2004). The retention of organic Se species in tissue is also better, and it is thought that stored tissue Se can act as a reservoir, especially for production animals (Rayman 2008). Selenium enriched yeast (SY) is a feed additive that contains approximately 70% of organic Se in the form of selenomethionine (SeMet) (Rayman 2004). Selenium enriched yeast has been shown to increase the total Se concentration and blood Se status of production animals more efficiently than sodium selenite and, consequently to elevate the Se content of meat, milk and cheese (Juniper et al. 2008, 2009; Phipps et al. 2008). Applied SY does not improve animal productivity, e.g. growth (Haug et al. 2008) or milk production (Phipps et al. 2008), but it exerts a beneficial effect on the food chain since meat and dairy products are the main source of Se in human diets (Hartikainen 2005).

Selenium circulated to the food chain via biofortification of crops is mainly in the form of organic SeMet. The ability of plants to accumulate Se and metabolize it into organic Se compounds is dependent on soil available Se and sulphur (S) and varies among plant species. Plants can be divided to Se non-

accumulators, Se-indicators or Se-accumulators (White et al. 2004 and references therein). Typically plants contain less than 25 μg Se g⁻¹ DM, but the Se-indicators can accumulate up to 1,000 μg Se g⁻¹ DM and the Se-accumulators (e.g. few species of *Astragalus*) up to 20–40 mg Se g⁻¹ DM. According to current knowledge, the same transporters and enzymes active in sulphur uptake and metabolism are also responsible for Se metabolism (Pilon-Smits et al. 2009). The Se hyperaccumulating plants may however have specific transporters for Se uptake (Pilon-Smits et al. 2009). *Brassica* species favour sulphur, and the ability of *B. napus* to accumulate Se as well has been utilized for the phytoremediation of Se-rich soils. The harvested leaf material containing up to 3.5 mg Se kg⁻¹ DM is then used as a dietary Se supplement for sheep and cattle (Bañuelos and Mayland 2000). The Se accumulation in the seeds of *Brassica* species has been studied less. Lyons et al. (2009) reported that although the aerial parts of *B. rapa* contained 250 μg Se kg⁻¹ DW, the concentration in seeds was significantly lower, 150 μg Se kg⁻¹ DW.

To establish Se metabolism in plants, it is necessary to carry out speciation studies. Species extraction is the first stage of the process and the methods should prevent species interconversion. In the case of Se, enzymatic hydrolysis by using non-specific proteases such as Pronase E is the method of choice, because it offers the advantages of mild conditions and selectivity (Moreno et al. 2001). However, the methodology is extremely time-consuming and an alternative method for reducing sample treatment time is the combination of ultrasonic energy combined with enzymatic hydrolysis, the so-called enzymatic probe sonication (EPS) (Capelo et al. 2004). The use of this combination allows quantitative extraction of Se species in a short time. The resulting extract is further analyzed for species separation, detection and quantification, mainly by using the coupling HPLC-ICP-MS (Pederero and Madrid 2009). One of the main challenges related to Se speciation and the identification of individual Se-species is the lack of available Se compounds as standards. The loosely retained Se compounds can also be easily co-eluted from chromatographic column, leading to erroneous identification (Pederero and Madrid 2009). Thus, the establishment of a the protocol to circumvent these challenges is of a great importance for correct and unambiguous Se species identification in plants.

The aim of this study was to investigate the potential of *B. rapa* and *B. napus* to assimilate and biotransform Se and to accumulate organic Se species in their seeds. Special focus was on the protein fraction of seeds, the oil-free meal which is an important protein source in ruminant diets. A further aim was to identify the main Se species accumulating in *Brassica* seeds and meal and the nutritional value of Se enriched *Brassica* meal as a source of organic Se compounds in ruminant diet is discussed.

Materials and methods

The field experiments were carried out at Viikki Experimental Farm, University of Helsinki, Finland (EXP1) and at Kotkaniemi Experimental Farm, Yara-Suomi Ltd., Finland (EXP2). *B. rapa* (Hilight) and *B. napus* (4021B) were sown in separate experiments in a completely randomized block design with four replications. All 8 m² plots were fertilized at the time of sowing with 100 kgNha⁻¹ and three application levels of Se, 0, 5.6 and 20 g Se ha⁻¹ as Na₂SeO₄. The composition of fertilizers were; N27-P0-K0-Mg4-Se0, N27-P0-K0-Mg1-S4-B0.02-Se0.0015 and N26-P0-K1-S3-Mg1-B0.02-Se0.005. A foliar spray of Na₂SeO₄ or Na₂SeO₃ of 0 and 30 g Se ha⁻¹ was applied a month after the sowing when the plants were at rosette stage. Before sowing, the field was treated with the pre-emergent herbicide Super Treflan (Dow AgroSciences) and pesticide spray (Decis 25EC, Bayer CropScience) was applied as required. The soil was characterized as silty clay soil with pH 6.2 (EXP1) and as medium clay soil with pH 6.3–6.4 and Se <0.01 mg L⁻¹ (EXP2).

During the growing period the following observations were made; density of seedlings (BBCH 12), vitality of plants (BBCH 60) and the length of siliques (BBCH 63). At the end of the growing season, ten plants from each plot were collected for the analysis of plant height and major yield components describing the canopy structure: number of side branches and the number of siliques in main branch and side branches. Plots were harvested at maturity by threshing machine (Massey Ferguson), and dried at 35°C to 9% moisture content. The 1,000 seed weight (g) was determined and the oil content was measured using NMS110 minispec NMR analyzer (Bruker) using 20 g of seeds. Five grams of seeds were used for the extraction of oil and

separation of the meal fraction. The seeds were shaken and ground for 40 min in metal tubes containing 30 mL of petroleum ether (Sigma-Aldrich) and three metal balls. The liquid fraction containing oil was separated by filtration and the meal fraction was dried at +80°C for 20 min.

Analysis of total selenium concentration

The Se concentration of the seed meal (Table 3, EXP1 and EXP2) was determined by the electrothermal atomic absorption spectrophotometric method (Kumpulainen et al. 1983). An in-house reference sample was included for every analytical round. For Se determination of seeds and meal (Table 5), ICP-MS was used. Samples of approximately 0.2 g were digested in a microwave oven by using 2.5 mL of HNO₃ (65%) and 0.5 mL H₂O₂ (35%). The solutions obtained were diluted with ultrapure water up to 25 mL. The operating conditions for ICP-MS are given in Table 1.

Separation, identification and quantification of Se species

Selenium speciation in different samples was analysed by HPLC-ICP-MS after extraction of Se species with enzymatic hydrolysis. Enzymatic hydrolysis was performed by using two methods: incubation in a controlled temperature incubator and ultrasonic probe. In controlled temperature incubation, about 0.05 g of sample were weighed into 5 mL tubes with 20 mg of enzyme (Protease type XIV, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and 3 mL of 30 mM Tris solution (pH 7.5) (Fluka). The tubes were incubated in a gravity convection oven (Heraeus D-6450 Hanau, USA) for 24 h at 37°C. In the ultrasonic probe method a 0.05 g portion of sample and 3 mL Milli-Q water were placed in a tube with 20 mg of Protease XIV. The samples were sonicated for 2 min at 40% ultrasound amplitude in a Sonoplus ultrasonic homogenizer (Bandenlin, Germany) equipped with a titanium 3 mm diameter microtip and fitted with a high-frequency generator of 2,200 W at frequency of 20 KHz. After proteolysis, the samples were centrifuged at 11,000 rpm for 15 min (Eppendorf Centrifuge 5804 R F34-6-38, Hamburg, Germany) using 10 KDa cut-off filters (Millipore, USA). The aqueous extracts were filtered through a 0.22 µm filter.

Table 1 Instrumental operating conditions for LC and ICP-MS systems

ICP-MS parameters	
Forward power	1,250 W
Plasma gas flow rate	15 Lmin ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	0.73 Lmin ⁻¹
Nebulizer gas flow rate	0.83 Lmin ⁻¹
Collision gas	93% He, 7%H
Collision gas flow rate	8.8 mLmin ⁻¹
Nebulizer	Meinhard
Spray chamber	Impact Bead Quartz Spray
Isotope monitored	⁸⁰ Se, ⁷⁸ Se, ⁷⁶ Se and ⁷⁴ Se
Dwell time per point	200 ms
Replicates	3
LC parameters	
Anion exchange	
Column	Hamilton PRP-X100 (250×4.1 mm, 10 μm)
Mobile phase	0.2% citric acid, 2% methanol (pH 5)
Injection volume	100 μL
Flow rate	1 mLmin ⁻¹
Column temperature	25°C
Elution mode	Isocratic
Size exclusion anion exchange	
Column	Shodex Asahipak GS-220HQ (300×7.6 mm, 2 μm)
Mobile phase	25 mM ammonium acetate (pH 6.7)
Injection volume	100 μL
Flow rate	0.7 mLmin ⁻¹
Column temperature	25°C
Elution mode	Isocratic

The resulting extracts were analysed by HPLC-ICP-MS. The HPLC consisted of a PU-2089 HPLC pump (JASCO, Tokio, Japan) fitted with a six-port injection valve (model 7725i, Rheodyne, Rohner Park, CA, USA) with a 100-μL injection loop. In order to get unambiguous identification of the species, the extracts from enzymatic hydrolysis were run through two different chromatographic columns, a Hamilton PRP-X100 (250×4.1 mm, 10 μm) column and a Shodex Asahipak GS-220HQ (300×7.6 mm, 2 μm) column, with different retention mechanisms: anion exchange and a combination of size exclusion and anion exchange. Analyses were performed by ICP-MS in

time resolved analysis mode and the operating conditions of LC-ICP-MS are summarized in Table 1.

Standard stock solutions of 1,000 mg L⁻¹ of selenomethionine (SeMet), selenomethylselenocysteine (SeMetSeCys) and selenocystine (SeCys₂) (Sigma) were prepared in ultra-pure water (18.2 MΩ cm⁻¹) from a Milli-Q water purification system (Millipore, MA, USA), and 3% hydrochloric acid was added for better dissolution of SeCys₂ and SeMetSeCys. Inorganic selenium solutions were prepared by dissolving sodium selenite (Na₂SeO₃) and selenate (Na₂SeO₄) (Merck) in Milli-Q water. Stock solutions were stored at 4°C, whereas working standard solutions were prepared daily by dilution.

Data analysis

The data was tested using analysis of variance (ANOVA) in the GLM procedure of SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Significantly different means between treatments were separated with Tukey HSD tests.

Results

Yield parameters and selenium content of *Brassica* meal

Both of the field experiments (EXP1 and EXP2) were affected by the spring drought, but the densities of the plant canopies were dissimilar at the two locations. EXP1 suffered from spring drought more severely and the canopy was thin (73 to 86 plants m⁻²), whereas in EXP2 the canopy was dense (113 to 201 plants m⁻²) (Table 2). The plants showed plasticity in the formation of yield components; at low density the plants had more side branches and siliques per side branch and yield reduction was not observed (Table 3). In the dense canopy of *B. rapa* in EXP2, the Se supplementation to soil (6 g Se ha⁻¹) followed with foliar application of Na₂SeO₄ was associated with a statistically significant increase in the number of siliques in the main branch (Table 2). A similar trend, although not significant, was seen also in EXP1. In *B. napus* no effect on yield components was observed. The increased number of siliques in main branch in the Se-treated *B. rapa* was not associated with a decrease in the seed size (Table 3). As the number of seeds per silique was not calculated, the influence of Se application on seed formation could not be assessed.

Table 2 Canopy density (number of plants m^{-2}), plant height (cm), number of siliques in main and side branches, and number of side branches in *B. rapa* and *B. napus* plantssupplemented with Na_2SeO_4 in soil Se0, Se6 and Se20 (0, 6 or 20 g Se ha^{-1}) and leaves as Na_2SeO_4 (Se^{6+}) or Na_2SeO_3 (Se^{4+}) (30 g Se ha^{-1}) in two experimental locations (EXP1, EXP2)

	<i>B. rapa</i>					<i>B. napus</i>				
	Density	Height	Siliques in main branch	Side branch	Siliques in side branch	Density	Height	Siliques in main branch	Side branch	Siliques in side branch
EXP 1										
Se0	82 ^a	128 ^a	34.5 ^a	4.6 ^a	81.4 ^a	83 ^a	114 ^a	23.2 ^a	3.7 ^a	59.4 ^a
Se0+Se ⁶⁺	85 ^a	129 ^a	36.0 ^a	4.9 ^a	93.1 ^a	73 ^a	108 ^a	23.1 ^a	3.7 ^a	49.2 ^a
Se0+Se ⁴⁺	75 ^a	133 ^a	36.7 ^a	5.4 ^a	98.4 ^a	75 ^a	109 ^a	22.4 ^a	3.8 ^a	61.7 ^a
Se6	86 ^a	125 ^a	33.3 ^a	5.4 ^a	86.3 ^a	80 ^a	109 ^a	22.9 ^a	3.2 ^a	39.0 ^a
Se6+Se ⁶⁺	73 ^a	132 ^a	36.2 ^a	5.3 ^a	111.5 ^a	76 ^a	105 ^a	22.4 ^a	2.7 ^a	32.1 ^a
Se6+Se ⁴⁺	78 ^a	127 ^a	32.4 ^a	4.5 ^a	76.4 ^a	77 ^a	103 ^a	24.6 ^a	3.5 ^a	52.1 ^a
Se20	78 ^a	130 ^a	34.6 ^a	4.8 ^a	87.4 ^a	76 ^a	107 ^a	23.2 ^a	3.9 ^a	40.4 ^a
Se20+Se ⁶⁺	82 ^a	133 ^a	38.1 ^a	5.0 ^a	102.3 ^a	75 ^a	109 ^a	24.7 ^a	3.7 ^a	44.8 ^a
Se20+Se ⁴⁺	75 ^a	127 ^a	33.7 ^a	4.8 ^a	93.9 ^a	82 ^a	108 ^a	26.2 ^a	3.4 ^a	46.4 ^a
EXP 2										
Se0	146 ^a	114 ^a	18.9 ^b	2.7 ^a	37.3 ^a	161 ^a	99 ^a	21.5 ^a	2.3 ^a	32.9 ^a
Se0+Se ⁶⁺	160 ^a	115 ^a	22.7 ^{ab}	2.7 ^a	33.5 ^a	201 ^a	101 ^a	22.3 ^a	2.2 ^a	34.8 ^a
Se0+Se ⁴⁺	168 ^a	108 ^a	23.8 ^{ab}	2.7 ^a	46.8 ^a	190 ^a	100 ^a	22.8	2.2 ^a	33.8 ^a
Se6	137 ^a	107 ^a	26.9 ^{ab}	3.3 ^a	63.2 ^a	175 ^a	105 ^a	19.2 ^a	2.1 ^a	26.9 ^a
Se6+Se ⁶⁺	113 ^a	112 ^a	27.7 ^a	3.0 ^a	47.5 ^a	179 ^a	108 ^a	21.6 ^a	2.1 ^a	26.9 ^a
Se6+Se ⁴⁺	145 ^a	115 ^a	24.8 ^{ab}	2.9 ^a	45.3 ^a	190 ^a	103 ^a	20.3 ^a	2.1 ^a	22.6 ^a
Se20	157 ^a	113 ^a	23.3 ^{ab}	2.6 ^a	37.5 ^a	185 ^a	101 ^a	20.8 ^a	2.1 ^a	27.2 ^a
Se20+Se ⁶⁺	148 ^a	116 ^a	26.3 ^{ab}	3.0 ^a	47.2 ^a	181 ^a	102 ^a	20.4 ^a	2.3 ^a	31.0 ^a
Se20+Se ⁴⁺	123 ^a	113 ^a	24.5 ^{ab}	3.1 ^a	47.4 ^a	175 ^a	102 ^a	22.2 ^a	2.3 ^a	32.5 ^a

Means ($n=4$) within a column followed by a different letter differ significantly ($p<0.05$, Tukey HSD). Experiments and columns are tested separately

The Se application did not affect seed yield or oil content of the seeds (Table 3). The level of Na_2SeO_4 applied to soil was reflected in the Se concentration in the protein rich meal fraction. The foliar Se spray of Na_2SeO_4 solution alone was sufficient to increase the Se concentration of the meal from 0.05 $\mu g g^{-1}$ to 0.54–1.00 $\mu g g^{-1}$, and the low and the high Se soil application increased it further to 0.88–1.15 $\mu g g^{-1}$ and 1.48–1.84 $\mu g g^{-1}$, respectively. Foliar Na_2SeO_3 solution spray had a minor effect on Se content in the meal. At any given dosage, the Se concentration of the meal was slightly higher in *B. rapa* than in *B. napus*, especially in EXP1. At the time of foliar spray, the *B. rapa* plants had reached rosette stage at developmental stage BBCH 33, whereas *B. napus* was still at BBCH 30. As the target Se concentration of *Brassica* meal for feed industry can be set to 1.0 $\mu g Se g^{-1}$, the level can be

obtained in both locations and species by supplementing the soil Na_2SeO_4 application (6 g Se ha^{-1}) with foliar spray of Na_2SeO_4 at the rosette stage. The total recovery (grain and straw) of applied Se was measured for the plots supplemented Se in soil. The *Brassica* seed yield in these experiments was 2,000 to 3,200 kg ha^{-1} and the recovery of Se 5.5–6.0% (6 or 20 g Se ha^{-1} in soil).

Selenium speciation studies

Similar Se concentration values were obtained from both proteolytic and acid digestion, suggesting that enzymatic hydrolysis was capable of extracting the Se compounds from the samples using either the ultrasonic probe or incubation bath (Table 4). Enzymatic hydrolysis with ultrasonic probe sonication was selected for further studies since it drasti-

Table 3 Yield (kg ha⁻¹), 1,000 seed weight (sw, g), oil content (%) and Se concentration of *Brassica* meal (μg g⁻¹ DW) of plants supplemented with Na₂SeO₄ in soil Se0, Se6 and Se20 (0.6 or 20 g Se ha⁻¹) and leaves as Na₂SeO₄ (Se⁶⁺) or Na₂SeO₃ (Se⁴⁺) (30 g Se ha⁻¹) in two experimental locations (EXP1, EXP2)

	<i>B.rapa</i>				<i>B.napus</i>			
	yield	1,000 sw	oil	Se	yield	1,000 sw	oil	Se
EXP 1								
Se0	3,188 ^a	n.d.	39.1 ^a	0.05 ^f	2,473 ^a	n.d.	40.3 ^a	0.05 ^e
Se0+Se ⁶⁺	3,033 ^a	n.d.	39.0 ^a	1.00 ^{bc}	2,441 ^a	n.d.	40.2 ^a	0.94 ^b
Se0+Se ⁴⁺	3,009 ^a	n.d.	39.2 ^a	0.23 ^{ef}	2,508 ^a	n.d.	39.6 ^a	0.18 ^e
Se6	3,184 ^a	n.d.	39.0 ^a	0.23 ^{ef}	2,499 ^a	n.d.	40.1 ^a	0.24 ^{dc}
Se6+Se ⁶⁺	3,087 ^a	n.d.	39.0 ^a	1.15 ^b	2,486 ^a	n.d.	40.3 ^a	1.07 ^{ab}
Se6+Se ⁴⁺	3,170 ^a	n.d.	39.0 ^a	0.43 ^{def}	2,487	n.d.	40.2 ^a	0.38 ^{cde}
Se20	3,109 ^a	n.d.	39.0 ^a	0.60 ^{cde}	2,475 ^a	n.d.	40.3 ^a	0.68 ^{bcd}
Se20+Se ⁶⁺	3,103 ^a	n.d.	39.0 ^a	1.84 ^a	2,289 ^a	n.d.	40.0 ^a	1.48 ^a
Se20+Se ⁴⁺	3,206 ^a	n.d.	39.0 ^a	0.79 ^{bcd}	2,418 ^a	n.d.	40.4 ^a	0.75 ^{bc}
EXP2								
Se0	2,179 ^a	2.4 ^a	45.0 ^a	0.05 ^e	2,222 ^a	2.9 ^a	43.9 ^a	0.05 ^e
Se0+Se ⁶⁺	2,061 ^a	2.5 ^a	44.5 ^a	0.95 ^b	2,173 ^a	2.9 ^a	43.6 ^a	0.54 ^c
Se0+Se ⁴⁺	2,060 ^a	2.4 ^a	44.7 ^a	0.31 ^{de}	2,306 ^a	2.9 ^a	43.0 ^a	0.12 ^e
Se6	1,862 ^a	2.4 ^a	44.5 ^a	0.25 ^{de}	2,330 ^a	3.0 ^a	43.7 ^a	0.23 ^{de}
Se6+Se ⁶⁺	2,075 ^a	2.5 ^a	44.8 ^a	0.88 ^b	2,233 ^a	3.0 ^a	44.2 ^a	0.89 ^b
Se6+Se ⁴⁺	2,018 ^a	2.4 ^a	44.6 ^a	0.50 ^{cd}	2,351 ^a	2.8 ^a	44.1 ^a	0.35 ^{cd}
Se20	2,173 ^a	2.4 ^a	44.6 ^a	0.76 ^{bc}	2,336 ^a	2.9 ^a	43.3 ^a	0.80 ^b
Se20+Se ⁶⁺	2,040 ^a	2.4 ^a	44.3 ^a	1.59 ^a	2,293 ^a	3.0 ^a	44.2 ^a	1.55 ^a
Se20+Se ⁴⁺	2,145 ^a	2.4 ^a	44.7 ^a	1.05 ^b	2,151 ^a	2.9 ^a	44.2 ^a	0.85 ^b

Means ($n=4$) within a column followed by a different letter differ significantly ($p<0.05$, Tukey HSD)

Experiments and columns are tested separately. N.d. not determined

cally decreased the sample treatment time from 12 h to 2 min.

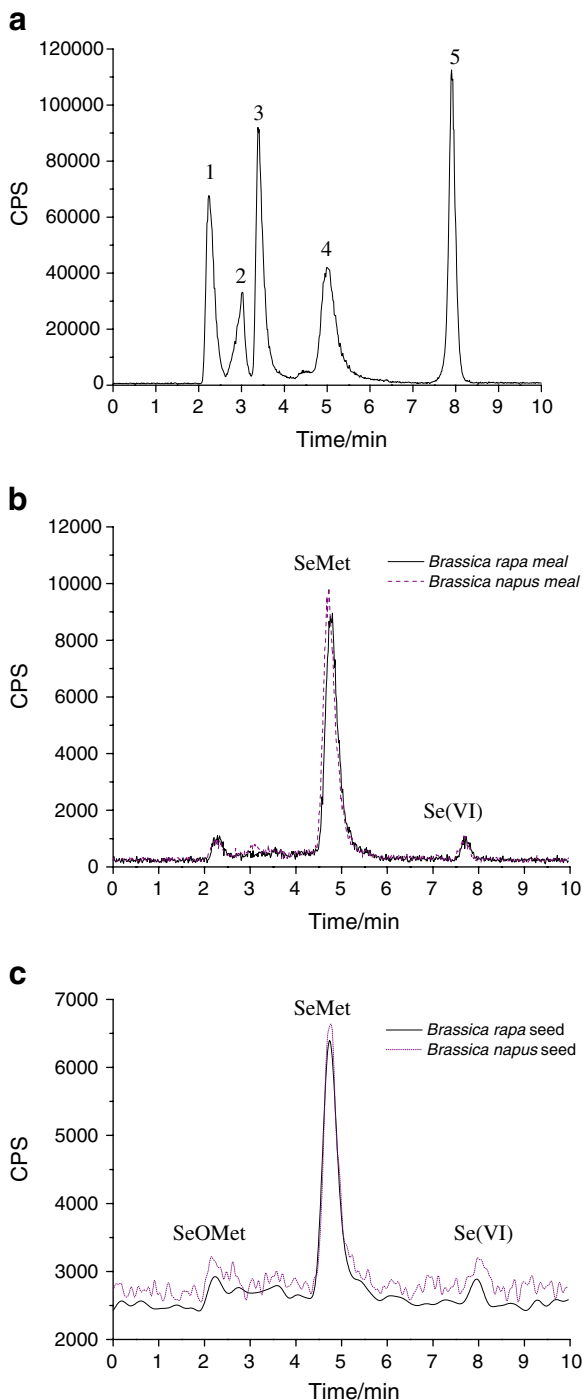
Figure 1a and b show the chromatographic profiles of Se standards and the enzymatically hydrolyzed meal samples by anion exchange LC-ICP-MS, respectively.

Table 4 Total selenium concentration following different sample preparation methods in *B. rapa* and *B. napus* seed meal from plants supplemented with 6 g Se ha⁻¹ as Na₂SeO₄ in soil and 30 g Se ha⁻¹ as foliar spray Na₂SeO₄. Means ($n=3$) ± Stdev

Meal samples	Acid digestion (μg Se g ⁻¹)	Enzymatic hydrolysis (μg Se g ⁻¹)	
		Ultrasonic probe	Gravity convection oven
<i>B. rapa</i>	2.24±0.20	2.40±0.07	2.24±0.06
<i>B. napus</i>	2.40±0.08	2.32±0.30	2.15±0.12

SeMet was identified by comparing the retention times of standards and by spiking experiments. Other minor species were found in *Brassica* meal by anion exchange LC-ICP-MS, such as Se (VI) (Fig. 1b). A second chromatographic column separation combining anion exchange and size exclusion mechanisms detected a peak corresponding to SeMet (Fig. 2a) in the enzymatically hydrolyzed meal samples (Fig. 2b). These results corroborate the data from the anion-exchange column. The main selenocompound in all meal samples tested was SeMet, regardless of Se treatment applied to the plants. Similarly in the seeds, the main accumulating Se compound was SeMet for all treatments (Figs. 1c and 2c).

The amounts of SeMet and SeO₄²⁻ found after each treatment along with mass balance are presented in Table 5. Up to 80% of the total Se was assimilated to SeMet and only traces of inorganic SeO₄²⁻ were



detected. The Se application method and the Se species added in the foliar spray did not affect the percentage of SeMet in the total Se. Thus, the high total Se concentration resulted also in a high SeMet concentration in both the seeds and the meal. In the

Fig. 1 Chromatographic profile obtained by anion exchange LC-ICP-MS for ^{80}Se corresponding to **a** Mixture of Se standards containing $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of each Se species standards 1. SeCys₂, 2. SeMeSeCys, 3. Se (IV), 4. SeMet, 5. Se (VI). **b** Enzymatic extraction of *B. napus* and *B. rapa* meal in plants supplemented with 6 g Se ha^{-1} as Na_2SeO_4 in soil and 30 g Se ha^{-1} as foliar spray **c** Enzymatic extraction of *B. napus* and *B. rapa* seeds in plants supplemented with 6 g Se ha^{-1} as Na_2SeO_4 in soil and 30 g Se ha^{-1} as foliar spray

plants given additional foliar Na_2SeO_4 , the accumulation of SeMet ranged from 0.861 to $1.365 \mu\text{g g}^{-1}$. The foliar application of Na_2SeO_4 efficiently increased SeMet concentration in the meal, whereas that of Na_2SeO_3 had only a small effect. When the total Se fertilization increased from 6 to 20 g Se ha^{-1} , the SeMet content rose from 0.199 to $0.567 \mu\text{g g}^{-1}$. Thus, the foliar application of Na_2SeO_4 alone was more efficient resulting in $0.861 \mu\text{g SeMet g}^{-1}$. The two *Brassica* species did not differ in their efficiency in assimilating the applied Se to SeMet.

The variation in the recovery of Se (%) was larger while entire seeds (55 – 102%) than in the meal (66 – 82%) samples, which challenges the interpretation of the localization of Se within the seed. On average, the seeds consist of 40% oil, and the remainder is mainly in the forms of protein, carbohydrates and seed coat fraction which is called the meal. The results show that most of the Se accumulated in the seed was in the meal components.

Discussion

There is increasing evidence that Se can have beneficial effects on the growth, yield formation and stress tolerance of plants (Hartikainen 2005). The physiological, biochemical or molecular mechanisms behind the stimulated growth and improved tolerance have not yet been determined. Nevertheless, enhanced antioxidant capacity (reviewed in Hartikainen 2005) and more efficient accumulation of carbohydrates (Turakainen et al. 2004) are thought to be contributing factors in the better performance of the plants. In greenhouse experiments (Lyons et al. 2009), where the cross-contamination of control plants by volatile Se compounds was carefully restricted, Se increased the seed production of *Brassica rapa* and there were positive effects of Se on the germination of *Brassica* seeds and pollen viability of the flowers. In the present study, no yield improvement or changes in the

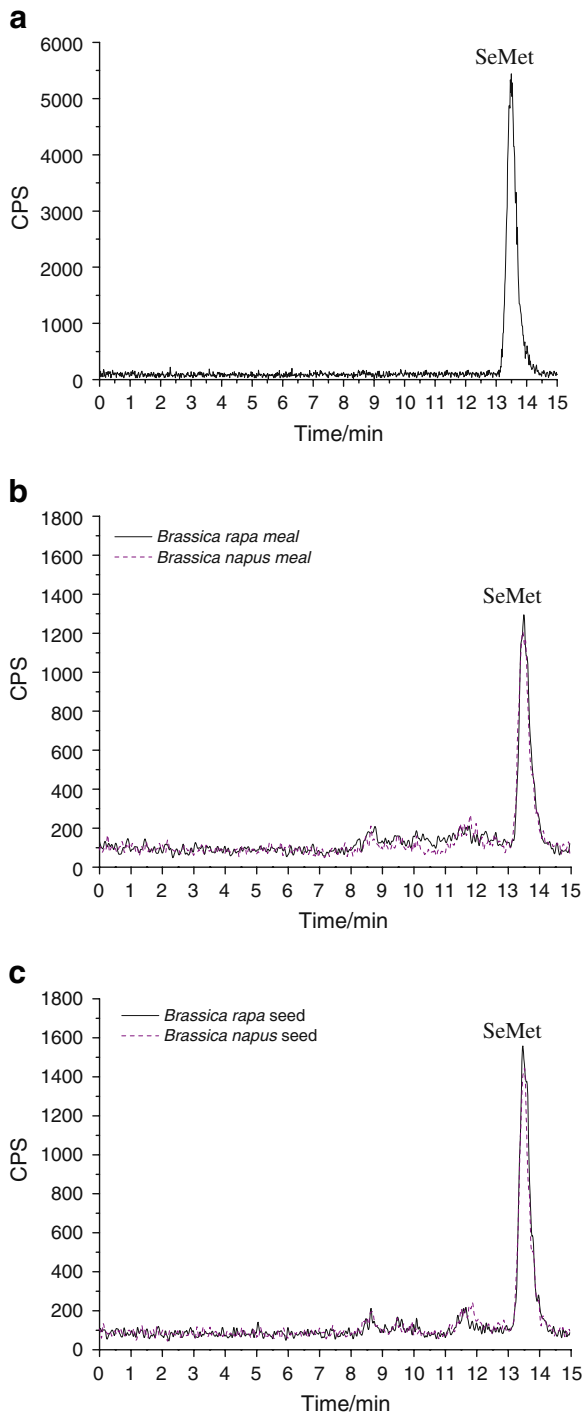


Fig. 2 Chromatographic profile obtained by size exclusion anion exchange LC-ICP-MS for ^{80}Se corresponding to **a** SeMet standard, $50 \mu\text{g g}^{-1}$; **b** Enzymatic extraction of *B. napus* and *B. rapa* meal in plants supplemented with 6 g Se ha^{-1} as Na_2SeO_4 in soil and 30 g Se ha^{-1} as foliar spray **c** Enzymatic extraction of *B. napus* and *B. rapa* seeds in plants supplemented with 6 g Se ha^{-1} as Na_2SeO_4 in soil and 30 g Se ha^{-1} as foliar spray

oil concentration were attributed to the Se treatment of either *B. rapa* or *B. napus* plants. However, the plant morphology was affected. In the Se-treated *B. rapa*, more siliques tended to be formed in the main branch rather than in side branches. This indicates that the availability or distribution of carbohydrates within the plant could be altered. Supporting observations were obtained in a greenhouse experiment in *B. rapa* (data not shown). Lyons et al. (2009) reported on positive responses of seed yield to Se in greenhouse experiments but not in the field. The discrepancy may have been due to trace amounts of Se in the field soil. In our study, the field experiment was conducted in soils that have been fertilized with Se in previous years, and trace amounts of Se ($0.05 \mu\text{g Se g}^{-1}$) accumulated in seeds and meal of control plants. As compared to the greenhouse experiment, where yield benefits were detected, the Se concentration of the seeds was only $0.004 \mu\text{g Se g}^{-1}$ in the control plants (Lyons et al. 2009). Thus, the trace amounts of Se in soil may have been sufficient for the yield formation also in the present field experiment.

Both *Brassica* species accumulated high amounts of Se in the protein fraction (meal) of the seed. The total recovery of applied Se to seeds and straw was approx. 6% which is lower than the 20–35% of Se recovery reported for wheat by Broadley et al. (2010). The substantially lower seed yield of *Brassica* (2 to 3 t ha^{-1}) compared to winter wheat (6 to 10 t ha^{-1}) most probably explains these differences in Se recovery. Sprayed Na_2SeO_4 and Na_2SeO_3 were both substantially metabolised into SeMet, and up to 85% of Se was in the form of SeMet. The dominance of SeMet as the main Se species in both meal and seeds implies that processing of *Brassica* seed to defatted meal does not alter the SeMet originally present in seeds. The percentage of total Se as SeMet was the same as that in the selenised yeast used in feed additives (see e.g. Rayman 2004). The SeMet content in meal increased to $0.86 \mu\text{g g}^{-1}$ when Na_2SeO_4 was applied as foliar spray and the soil application of 6 or 20 mg Se ha^{-1} elevated the level further to 0.98 and $1.37 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively. Without Se application, only traces of SeMet were detected in the meal. In feeding experiments with SY, where positive effects on blood GSH-Px activity have been reported, the Se content of the concentrate blends were 0.98 – $1.98 \text{ mg Se kg}^{-1} \text{ DM}$, resulting 0.30 – 0.51 mg kg^{-1} in the mixed feed (Juniper et al.

Table 5 Concentration of SeMet ($\mu\text{g g}^{-1}$), inorganic selenate ($\mu\text{g g}^{-1}$), total Se ($\mu\text{g g}^{-1}$) and ratio of SeMet to total Se (%) in the meal and seeds of plants supplemented with Na_2SeO_4 in soil Se0, Se6 and Se20 (0.6 or 20 g Se ha^{-1}) and leaves as Na_2SeO_4 (Se^{6+}) or Na_2SeO_3 (Se^{4+}) (30 g Se ha^{-1}) in EXP1

	<i>B.rapa</i>					<i>B.napus</i>				
	SeMet	Se^{6+}	Total Se	SeMet/ Se	R (%)	SeMet	Se^{6+}	Total Se	SeMet/ Se	R (%)
Meal										
Se0	0.033±0.002	0.003±0.000	0.046±0.005	72	79±5	0.047±0.003	0.003±0.000	0.060±0.010	78	84±5
Se0+Se ⁶⁺	0.861±0.052	0.055±0.003	1.137±0.050	76	81±5	0.793±0.048	0.026±0.002	1.235±0.075	64	66±4
Se0+Se ⁴⁺	0.237±0.015	–	0.327±0.025	72	72±5	0.192±0.008	–	0.250±0.020	77	77±3
Se6	0.199±0.011	–	0.268±0.019	74	74±4	0.199±0.018	–	0.245±0.034	81	81±7
Se6+Se ⁶⁺	0.988±0.014	–	1.445±0.080	68	68±1	0.951±0.023	–	1.345±0.095	71	71±2
Se6+Se ⁴⁺	0.388±0.016	0.057±0.002	0.571±0.020	68	78±3	0.301±0.019	0.028±0.002	0.428±0.040	70	77±5
Se20	0.567±0.028	0.038±0.002	0.779±0.050	73	78±4	0.581±0.023	0.032±0.001	0.817±0.070	71	75±3
Se20+Se ⁶⁺	1.365±0.038	–	1.958±0.090	70	70±2	1.198±0.024	–	1.454±0.090	82	82±2
Se20+Se ⁴⁺	0.749±0.021	–	0.932±0.070	80	80±2	0.783±0.047	0.004±0.000	1.042±0.085	75	75±5
Seed										
Se0	0.141±0.020	–	0.170±0.024	83	83±12	0.042±0.003	–	0.076±0.006	55	55±4
Se0+Se ⁶⁺	1.005±0.023	–	1.521±0.035	66	66±1	0.427±0.017	–	0.659±0.021	65	65±3
Se0+Se ⁴⁺	0.226±0.018	–	0.410±0.032	55	55±4	0.118±0.008	–	0.171±0.012	69	69±5
Se6	0.380±0.008	0.042±0.002	0.433±0.009	88	97±2	0.120±0.004	–	0.169±0.005	71	71±2
Se6+Se ⁶⁺	1.612±0.096	0.057±0.005	1.586±0.095	100	105±7	0.525±0.026	–	0.657±0.033	80	80±4
Se6+Se ⁴⁺	0.565±0.032	–	0.739±0.042	76	76±4	0.254±0.013	–	0.391±0.018	65	65±3
Se20	0.864±0.026	–	1.149±0.036	75	75±2	0.314±0.018	–	0.474±0.030	66	66±4
Se20+Se ⁶⁺	1.885±0.050	–	1.921±0.052	98	98±3	1.067±0.056	–	1.095±0.060	97	97±5
Se20+Se ⁴⁺	0.814±0.047	–	0.890±0.050	91	91±5	0.459±0.027	–	0.452±0.024	100	102±6

^a Average value ± standard deviation ($n=3$)

^b Recoveries calculated by comparing the sum of species with values of total Se obtained by acid digestion

2008). The Se-enriched *Brassica* meal can be used up to 50% as protein source in feed concentrates and it can significantly increase the amount of SeMet in ruminant diet.

Se accumulation was greater when Na_2SeO_4 rather than Na_2SeO_3 was used in foliar application. This finding agrees with previous studies with Indian mustard (*B. juncea*) where Se-enrichment with Na_2SeO_4 proved to be more efficient than that with Na_2SeO_3 (Montes-Bayón et al. 2002). In general, *Brassica* species can accumulate high concentrations of Se, and canola (*B. napus*) leaf material can contain as much as 3.5 mg Se kg^{-1} (Bañuelos and Mayland 2000). The Se tolerance in plants is thought to be related to the synthesis of non-structural selenoamino acids, allowing them to accumulate high amounts of Se without symptoms of toxicity (Ximenéz-Embúm et al. 2004). The accumulated SeMet can be incorporat-

ed into proteins, associated to biomolecules (Rúiz Encinar et al. 2003), or trapped in the cell walls (Polatajko et al. 2004), which are also the main components of the *Brassica* meal.

In the present study, methodology based on the use of HPLC-ICP-MS was optimized for seed and meal samples. The use of enzymatic probe sonication allowed quantitative extraction of Se species in a short period of time (2 min). No differences were observed in the chromatographic profiles when comparing the enzymatic hydrolysis using either control temperature incubator or ultrasonic probe (data not shown) showing that the use of the ultrasonic probe not only allowed quantitative extraction of species but also prevented species transformation. The action of ultrasound enhances the cleavage of proteins and complex structures (Capelo et al. 2004) and it has been successfully applied for samples

as diverse as vegetables (Pedrero et al. 2008), meat (Cabañero et al. 2005) and selenized yeast (Capelo et al. 2004). Despite the good results obtained previously, the methodology should be validated for each particular sample. Previous studies have shown that the main organic Se compound in the leaves, flower structures and roots of Se-enriched broccoli (*B. oleracea*) was selenomethylselenocysteine (SeMeSeCys) and not SeMet (Pedrero et al. 2008). Similarly, SeMeSeCys was the main Se compound also in Se-enriched garlic, onion and leek, whereas SeMet and selenate were the predominant Se species in cereal grains (Zhu et al. 2009) and potato tubers (Cuderman et al. 2008). In *Brassica*, the reported Se specification studies have been done with fresh leaf material and there are no other reports on Se species composition in seeds. The lack of other Se species in the seeds and meal may be due to instability of these compounds during seed drying and oil extraction. Results on rice indicate that the endosperm can accumulate SeMeSeCys if the seed Se concentration is high, up to 8 mg Se kg⁻¹ DW (Williams et al. 2009), so the retranslocation to seeds may not be the limiting factor for the accumulation of SeMeSeCys in *Brassica*.

The field experiments conducted in this study show that while Se application may not affect the quantity of *Brassica* seed or oil yield, it has a significant positive effect on the yield quality, as the valuable SeMet in the seed protein fraction increased. The Se species were successfully validated by the use of two chromatographic separation mechanisms that allowed a proper identification of SeMet and the performance of mass balance. The presence of other Se species was not detected in either seeds or meal, which may have been due to the degradation of unstable Se species during drying and processing of the seeds. Our results show that the agronomic biofortification with Se can improve the nutritional quality of *Brassica* meal and the capacity of *Brassica* species to accumulate Se gives an attractive option for increasing the SeMet concentration of animal diets.

Acknowledgements M. Seppänen greatly acknowledges Dr. Päivi Ekholm for assistance in Se analysis and Raisio Ltd. and Yara-Suomi Ltd. for their financial support and the Spanish team to the MICIN and Regional Government of Madrid for financial support through the projects CTQ-2008-05925 and CAM-S2009/AGR/1464 respectively.

References

- Bañuelos GS, Mayland HF (2000) Absorption and distribution of selenium in animals consuming canola grown for selenium phytoremediation. *Ecotoxicol Environ Saf* 46:322–328
- Broadley MR, Alcock MR, Alford J, Cartwright P, Foot I, Fairweather-Tait SJ, Hart DJ, Hurst R, Knott P, McGrath SP, Meacham MC, Norman K, Mowat H, Scott P, Stroud JL, Tovey M, Tucker M, White PJ, Young SD, Zhao F-J (2010) Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid and granular Se fertilization. *Plant Soil* 332:5–18
- Cabañero AI, Madrid Y, Cámara C (2005) Enzymatic probe sonication extraction of selenium in animal-based food samples: a new perspective on sample preparation for total and selenium speciation studies. *J Anal Bioanal Chem* 381:373–379
- Capelo JL, Ximenez-Embun P, Madrid-Albarran Y, Camara C (2004) Enzymatic probe sonication: enhancement of protease-catalyzed hydrolysis of selenium bound to proteins in yeast. *Anal Chem* 76:233–237
- Combs GF Jr (2001) Selenium in global food systems. *Br J Nutr* 85:517–542
- Cuderman P, Kreft I, Germ M, Kovacevic M, Stibilj V (2008) Selenium species in selenium-enriched and drought-exposed potatoes. *J Agric Food Chem* 56:9114–9120
- Flohe L, Günzler WA, Schock HH (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 32:132–134
- Gissel-Nielsen G (1998) Effects of selenium supplementation on field crops. In: Frankenberger WT Jr, Engberg RA (eds) *Environmental chemistry of selenium*. New York, Marcel Dekker Inc, pp 99–128
- Hartikainen H (2005) Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *J Trace Elem Med Biol* 18:309–318
- Haug A, Eich-Greatorex S, Bernhoft A, Hetland H, Song T (2008) Selenium bioavailability in chicken fed selenium-fertilized wheat. *Acta Agric Scand Sec A* 58:65–70
- Juniper DT, Phipps RH, Ramos-Morales W, Bertin G (2008) Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *J Anim Sci* 86:3100–3109
- Juniper DT, Phipps RH, Ramos-Morales W, Bertin G (2009) Effect of high dose selenium enriched yeast diets on the distribution of total selenium and selenium species within lamb tissue. *Livestock Sci* 122:63–67
- Kumpulainen J, Raittila A-M, Lehto J, Koivistoinen P (1983) Electrochemical atomic absorption spectrometric determination of selenium in foods and diets. *J Assoc Official Anal Chem* 66:1129–1135
- Lyons GH, Gene Y, Soole K, Stangoulis JCR, Liu F, Graham RD (2009) Selenium increases seed production in *Brassica*. *Plant Soil* 318:73–80
- Montes-Bayón M, LeDuc DL, Terry N, Caruso JA (2002) Selenium speciation in wild type and genetically modified Se accumulating plants with HPLC separation and ICP-MS/ES-MS detection. *J Anal At Spectrom* 17:872–879
- Moreno P, Quijano MA, Gutierrez AM, Perez-Conde C, Cámara C (2001) Fractionation studies of selenium compounds from

- oysters and their determination by high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* 16:1044–1050
- Pederero Z, Madrid Y (2009) Novel approaches for selenium speciation in food stuffs and biological specimens. *Anal Chim Acta* 634:135–152
- Pedrero Z, Madrid Y, Hartikainen H, Cámara C (2008) Protective effect of selenium in broccoli (*Brassica oleracea*) plants subjected to cadmium exposure. *J Agric Food Chem* 56:266–271
- Phipps RH, Grandison AS, Jones AK, Juniper DT, Ramos-Morales W, Bertin G (2008) Selenium supplementation of lactating dairy cows: effects on milk production and total selenium content and specification in blood, milk and cheese. *Animal* 2:1610–1618
- Pilon-Smits EAH, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M (2009) Physiological functions of beneficial elements. *Curr Opin Plant Biol* 12:267–274
- Polatajko A, Sliwka-Kaszynska M, Dernovics M, Ruzik R, Ruiz Encinar J, Szpunar J (2004) A systematic approach to selenium speciation in selenized yeast. *J Anal Atomic Spectrom* 19:114–120
- Rayman M (2004) The use of high-Se yeast to raise Selenium status—how does it measure up? *Br J Nutr* 92:557–573
- Rayman M (2008) Food-chain selenium and human health: emphases on intake. *Br J Nutr* 100:254–268
- Rotruck JT, Pope AH, Genthe HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179:588–590
- Ruíz Encinar J, Ruzik R, Buchmann W, Tortajada J, Lobinski R, Szpunar J (2003) Detection of selenocompounds in triptic digest of yeast selenoproteins by MALDI-TOF-MS prior to their structural analysis by ESI-MS. *Analyst* 128:220–224
- Schwartz K, Foltz CM (1957) Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degradation. *J Am Chem Soc* 79:3292–3293
- Turakainen M, Hartikainen H, Seppänen M (2004) Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *J Agric Food Chem* 52:5378–5382
- White PJ, Bowen HC, Parmaguru P, Fritz M, Spracken WP, Spiby RE, Meacham MC, Mead A, Harriman M, Trueman LJ, Smith BM, Thomas B, Broadley MR (2004) Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 55:1927–1937
- Williams PN, Lombi E, Sun G-X, Schenkel K, Zhu Y-G, Feng X, Zhu J, Carey A-M, Adomako E, Lawgali Y, Deacon C, Meharg AA (2009) Selenium characterisation in the global rice supply chain. *Environ Sci Technol* 43:6024–6030
- Zhu Y-G, Pilon-Smits EAH, Zhao F-J, Williams PN, Meharg AA (2009) Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends Plant Sci* 14:436–442
- Ximénez-Embú I, Alonso Y, Madrid-Albarrán Y, Cámara C (2004) Establishment of selenium uptake and species distribution in lupine, Indian mustard, and sunflower plants. *J Agric Food Chem* 52:832–838

I.2. Dinámicas de la asimilación de Selenio y Metabolismo de Especies de Selenio Orgánicas en Hojas y Semillas de *Brassica napus* L

“The dynamics of selenium uptake and metabolism of organic selenium species in the leaves and seeds of *Brassica napus* L. ”

Plant Physiology (*Enviado*)

1 **The dynamics of selenium uptake and metabolism of organic selenium species in the leaves**
2 **and seeds of *Brassica napus* L.**

3 Mervi M. Seppänen (*), Juha Kontturi, Nashmin Ebrahimi

4 Department of Agricultural Sciences

5 P.O.Box 27, 00014 University of Helsinki

6 Finland

7 e-mail: mervi.seppanen@helsinki.fi

8 Phone : +358 50 415 0381

9 Fax : +358 9 191 58582

10 Helinä Hartikainen

11 Department of Food and Environmental Sciences

12 P.O.Box 27, 00014 University of Helsinki

13 Finland

14 Isabel Lopez Heras, Yolanda Madrid and Carmen Cámara

15 Departamento de Química Analítica

16 Universidad Complutense de Madrid

17 Avda Complutense s/n

18 28040 Madrid

19 Spain

20 * Date of Submission:

21 * 4 Tables and 7 Figures and 7129 words

22 *) corresponding author

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

Abstract

Selenium (Se), an essential micronutrient for humans and animals, is converted in plants from inorganic Se to various organic Se compounds via sulphur (S) assimilation pathway. In Se hyperaccumulators, the synthesis of non-protein Se amino acids such as anti-carcinogenic selenomethyl selenocysteine (SeMeSeCys) is a key tolerance mechanism preventing the incorporation of Se in proteins. Here we studied the ability of *Brassica napus* to synthesize organic Se species from inorganic selenate/selenite (SeVI/SeIV). Activation of *APS 1-3* and *SMT* gene homologues were monitored concomitantly with the accumulation of organic Se species 6 h, 7d and 14 d after Se application to follow the kinetics of Se metabolism. After 6 hours a 2-fold increase in transcript levels was detected together with accumulation of selenomethionine (SeMet)(15 %) and SeMeSeCys (4 %). After 14 d 33 µg Se g⁻¹ DM had accumulated, 33 % as SeMet, 60 % as SeVI whereas SeMeSeCys was no further detected. In seeds and protein-rich meal SeMet was the main organic Se compound (53 to 94 %). Analysis on the putative *B. napus* SMT protein sequence revealed a substitution typical for non-accumulators and may explain the low SeMeSeCys accumulation in *B. napus*. Selenium seems to activate the synthesis of nutritionally valuable SeMeSeCys in *B. napus*, but the capacity of this Se detoxification pathway is limited. Thus, the absence of SeMeSeCys in the seeds may not be due to poor translocation from leaves but rather explained by low level of synthesis accompanied probably with rapid volatilization of methylated Se compounds.

Key words: selenomethionine, selenomethyl selenocysteine

Abbreviations of long chemical names:

1 **Introduction**

2

3 Selenium (Se), an essential microelement for humans and animals, is circulated to food chain via
4 crop plants. However, its global distribution in rocks and soils is uneven resulting in areas where the
5 cultivated crops and locally produced foods and feeds are either deficient or toxic in Se
6 (Hartikainen 2005, Rayman 2008b). In areas of deficiency, such as in Finland, the adequate intake
7 of Se ($80 \mu\text{g Se day}^{-1}$) by humans is ensured by Se biofortification where the target Se content of
8 main cereals has been set to $0.1 \text{ mg Se kg}^{-1} \text{ DM}$ (Eurola et al., 2011). In some studies, higher daily
9 intake of Se (up to $200 \mu\text{g Se day}^{-1}$) have been shown to give additional health benefits such as
10 reduced cancer risk and improved immune system (Rayman 2008b). Selenium can be provided to
11 food chain in inorganic or organic forms. Organic Se species are less toxic and they have a better
12 retention in human and animal tissues (Rayman 2008b). The most abundant organic Se form is
13 selenomethionine (SeMet) which is also the main form e.g. in the seeds of Se biofortified *Brassica*
14 *rapa* and *napus* plants (Seppänen et al., 2010). Thus, the crop plants have an important role in
15 converting the inorganic Se provided in fertilizers into valuable organic forms.

16

17 Plant species differ in their ability to uptake and assimilate Se and can be divided into non-
18 accumulators or accumulators (reviewed in Terry et al., 2000). Non-accumulators contain typically
19 less than $25 \mu\text{g Se g}^{-1} \text{ DM}$ whereas accumulators may contain 20 to $40 \text{ mg Se g}^{-1} \text{ DM}$. *Brassica*
20 *juncea* and *B. napus* belong to a group of species between non-accumulators and accumulators, so
21 called Se indicators or secondary accumulators (Bañuelos et al., 1997). These species can
22 accumulate up to $1 \text{ mg Se g}^{-1} \text{ DM}$. The Se concentration is dictated by the bioavailability of Se in
23 soil or growth media. Actually, many *Brassica* sp. can accumulate more than $1 \text{ mg Se g}^{-1} \text{ DM}$ when
24 growing in high-Se soil (Bañuelos and Mayland 2000) or when growing in low-Se soil a transient
25 accumulation of high Se levels can be measured (Seppänen et. al., 2010). Some species such as

1 *Astragalus bisulcatus* are also able to accumulate high amounts of organic non-protein
2 selenocompounds such as selenomethyl selenocysteine (SeMeSeCys) (reviewed in Ellis and Salt
3 2003). SeMeSeCys has chemotherapeutic properties in humans and at the moment is the most
4 valuable organic Se species known (Rayman 2008a). The analytical procedure of these organic Se
5 species in plant material is, however, challenging. The most critical step is sample preparation and
6 separation of Se species. It can be done by non-specific proteases such as Protease E or by
7 combination of enzymatic hydrolysis with ultrasonic probe sonication (Seppänen et al. 2010). The
8 method has been used successfully in identification of SeMeSeCys and SeMet in the leaves and
9 flower structures of Se-enriched broccoli (Pedrero et al., 2007). In the seeds or protein-rich meal of
10 *Brassica* other organic Se species than SeMet was not detected may be due to instability of these
11 compounds and losses during drying and oil extraction processes (Seppänen et al., 2010).

12

13 In plants, the chemical similarity between SeVI and sulphate allows these anions to be taken up and
14 assimilated through the same Se/S pathway. Selenate is taken up by high-affinity sulphate
15 transporters in roots (Sors et al., 2005a, White and Broadley 2009) whereas phosphate transporters
16 are active in SeIV transport (Li et al., 2008). Selenate uptake is activated by adenosine triphosphate
17 sulphurylase (APS) and then reduced to SeIV by APS reductase. An overexpression of *APS* gene in
18 *Arabidopsis* results in increased Se content and assimilation in transgenic plants and it is proposed
19 to be the bottle-neck of Se assimilation in plants (Pilon-Smits et al., 1999). Also the activity of APS
20 reductase has a key role in controlling the flux through Se/S assimilation pathway (Vauclare et al.,
21 2002). Selenite is further reduced to selenide by sulphite reductase and then incorporated in serine
22 by cysteine synthetase to form SeCys. SeMet is synthesized from SeCys and *O*-phosphohomoserine
23 in multiple chemical reactions involving enzymes such as cystathione γ -synthase, cystathione β -
24 lyase and methionine synthase (Terry et al., 2000).

1 Many *Astragalus* and *Brassica* species can accumulate high amounts of Se without any symptoms
2 of toxicity. The current understanding is that the Se sensitive species incorporate SeCys and SeMet
3 in proteins whereas the Se tolerant species have mechanisms to methylate them to small non-protein
4 amino acids such as SeMeSeCys (Brown and Shrift 1981). Also, plant's ability to accumulate Se
5 correlates strongly with its capacity to biosynthesize these non-protein amino acids (reviewed in
6 Sors et al., 2005). In a Se hyperaccumulator *A. bisulcatus*, an enzyme responsible for the
7 methylation of SeMet and SeCys into SeMeSeCys is called selenocysteine methyltransferase (*SMT*)
8 (Neuhierl and Bock 1996). *SMT* enzyme shows a high degree of homology in accumulator and non-
9 accumulator plants but the enzyme lacks *SMT* activity in non-accumulators resulting in low or non-
10 detectable levels of SeMeSeCys (Sors et al., 2009). In addition, a site-directed mutagenesis
11 approached showed that a crucial amino acid mutation alanine (Ala) to threonine (Thr) was
12 responsible of specific capacity to methylate selenocysteine (SeCys).

13
14 *Brassica napus* is a Se secondary accumulator which seeds are an important source of vegetable oil
15 and protein for humans and animals. The potential of *B. napus* to synthesize organic Se compounds
16 is not known yet. The study was undertaken to investigate the dynamics of Se uptake and synthesis
17 of organic Se compounds in the leaves and seeds of *B. napus*. Based on the results the Se
18 detoxification mechanisms in *B. napus* are also discussed.

20 **Material and methods**

21 *Plant material and experimental conditions*

22
23 The plants were grown in greenhouse (16/8 h day/night) in 1.5 L pots containing a sand:quartz sand
24 mixture (900 g sand:400 g quartz sand) and supplied with following nutrient-compounds given in
25 total as mM: NH₄NO₃ 222.9, CaHPO₄ 50.3, KH₂PO₄ 67.1, MgSO₄ 65.0, H₃BO₃ 9.6, (NH₄)₆Mo₇O₂₄

1 0.5, CuSO₄ 0.8, ZnCl₂ 1.6, EDTA 3.7, MnCl₂ 4.7, Ni(NO₃)₂ 0.9. The nutrients were given in two
2 applications: 2/3 at the sowing and 1/3 two weeks later. Five *Brassica napus* (cv. 4021B) seeds
3 were sown were and thinned after germination to one plant pot⁻¹. Four weeks after sowing, 0 or 65
4 μM of Na₂SeO₄ (130 μg Se plant⁻¹) was added to the soil, and at the same time 0 or 100 μM of
5 either Na₂SeO₄ or Na₂SeO₃ (30 μg Se plant⁻¹) as a foliar spray. The pots were arranged in a
6 completely randomized block design with four replications with eight plants per treatment in each
7 replication. Three similar experiments were carried out.

8

9 *Plant growth and harvest*

10

11 Plant development was followed according to BBCH scale and the changes in leaf chlorophyll
12 content of marked leaves ($n = 4-5$ plant⁻¹) was monitored weekly using Chlorophyll meter SPAD-
13 502 (Minolta, Japan). Leaf samples of the same age were harvested and rinsed for RNA and Se
14 analysis after 6 hour, 7 and 14 days after Se application as well as during harvest. At harvest plant
15 height was measured and main yield components (number of side branches, the number of siliques
16 in main branch and side branches) were counted from five plants per treatment.

17

18 *Gene expression analysis*

19

20 For RNA-extractions, one upper leaf was harvested 6 h, 7 and 14 days after the Se treatment. The
21 RNA was extracted using TRI REAGENT® (Applied Biosystems) according to the manual. The
22 possible DNA contamination was removed by DNase I digestion (SuperScriptTM III CellsDirect
23 cDNA Synthesis System, Invitrogen). The cDNA was synthesized according to the manufacturer's
24 instructions (SuperScriptTM III Reverse Transcriptase, Invitrogen) using 1μg of total RNA and oligo

1 (dT)₁₈ primers. RNA complementary to the cDNA was removed by treatment with 1 µl of (2 units)
2 E.coli RNase H, and incubation at + 37 °C for 20 min.

3 The primers for sulphur metabolism genes in *B. napus* were designed against to the corresponding
4 gene sequences. For the internal control *β-actin* (F946 -ATCGTCCTCAGTGGTGGTTC, R1049 -
5 GCGACCACCTTGATCTTCAT), primers were designed against sequence (GenBank AF111812).
6 For *APS1* (F373 - AACATGTCGGTGCCTATCGT, R482 - AGGATAGCGACGGGATTACC),
7 *APS2* (F236 TCTCTTGCTTCACCCTTTGG, R341 CGGGTCAAGAACTCCATCTT), and *APS3*
8 (F188 - TCCGGAAAGAGCTTGAGAAA, R289 - GGCGAGTGTCAGTCATGAGA) primers
9 were designed to the following sequences GenBank U68218, EE463359 and EV120399
10 respectively. And for the *SMT* (F279- ATCTCCAGCGCTTCTTACCA, R394 -
11 TGCGAGCTTCACATGCTATT) against the corresponding EST: JCVI_9670
12 (<http://brassica.bbsrc.ac.uk/>). A new set of primers (F385 5'-ACCAGGCCACGATTCAGGGGT-3',
13 R1216 5'- ACGTGAGTGAAGGTGGAGGAGGA-3') were designed to study the potential Ala-184
14 to Thr replacement in SMT protein sequence (Sors et al. 2009) in a putative SMT protein of
15 *Brassica napus*. A 648 nucleotide long sequence was sequenced and translated to amino acid
16 sequence using translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>) and a Clustal W
17 (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) comparison was made between *B. napus*, *B. oleracea*
18 (AY817737.1) and *A. bisulcatus* (AJ131433.1) *SMT*-homologues.

19
20 Primer testing was done using 50 µl PCR reaction which contained 0.5 U of Taq polymerase
21 (DyNAzyme II, Finnzymes, Finland), 1 x buffer (DyNAzymeTM), 0,2 µmol of each primer, 200
22 µmol of dNTPs and 100 ng of genomic DNA. PCR was performed (Eppendorf Netheler- Hinz,
23 Hamburg, Germany) in the following conditions: 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 s at
24 94°C, 45 s at 57°C and 90 s at 72°C. The PCR fragments were excised from 1% TAE agarose gel
25 and purified using QIAquick® gel extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany), and cloned into the

1 pCR®2.1-TOPO cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manual. Cloned
2 fragments were sequenced at the Institute of Biotechnology (University of Helsinki) for the
3 verification of a correct amplification product.

4 Quantitative real time PCR analysis was carried out in Light Cycler® 480 Real-Time PCR System
5 (Roche Applied Science). A 20 µl reaction contained 10 µl of DyNAmo™ (Finnzymes, Finland)
6 SYBR® Green master mix, 0.5 µM of each primer, 100 ng of cDNA and 0.4 µl of passive ROX-
7 dye. All primers were tested in a cDNA-dilution series (1, 5, 10, 25, 50 and 100%) using the
8 following program: 95 °C 15 min, 40 x (94 °C 10 s, 59 °C 30 s and 72 °C 30 s), with a melting
9 curve 95 °C 15 s, 60 °C 20 s and 95°C. Efficiency (E) values for the *APSI*, *APS2* *APS3*, *SMT* and β -
10 *actin* primers were 2.07, 1.92, 2.15, 2.11 and 2.03. Expression levels of target genes were
11 normalized using β -*actin* as a reference gene and the relative expression was calculated using
12 $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak & Schmittgen 2001).

13

14 *Selenium analysis*

15

16 For the determination of total Se concentration the plant samples were dried overnight at + 70 °C
17 and the analysis was done with the electrothermal atomic absorption spectrometric (AAS) method
18 of (Kumpulainen et al., (1983) (Model 5100 Zeeman spectrometer, Perkin Elmer, USA) connected
19 to a graphite furnace (Model HGA 600 Perkin Elmer, USA) and equipped with a model AS-60
20 autosampler (Perkin Elmer, USA). The accuracy of the measurement was confirmed by including
21 an in-house reference sample to every set of samples. Selenium speciation in different samples was
22 analysed by HPLC-ICP-MS after extraction of Se species with ultrasonic probe assisted-enzymatic
23 hydrolysis. About 0.05 g of plant material and 3 mL Milli-Q water were placed in a tube with 20
24 mg of Protease XIV (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). The samples were sonicated for 2 min
25 at 40% ultrasound amplitude in a Sonoplus ultrasonic homogenizer (Bandelin, Germany) equipped

1 with titanium 3 mm diameter microtip and fitted with a high-frequency generator of 2200 W at
2 frequency of 20 KHz. After proteolysis, the samples were filtered through a 0.22 µm filter. The
3 extracts were analysed by HPLC-ICPMS following the experimental conditions given in Table 1. In
4 order to assess the correct identification of Se species, two chromatographic columns: an anion
5 exchange column and a Shodex Asahipak column, that combine size exclusion and ion exchange
6 mechanisms, were utilized. Standard stock solutions of 1000 mg L⁻¹ of SeMet, SeMeSeCys and
7 selenocystine (SeCys₂) (Sigma) were prepared in ultra-pure water (18.2 MΩ cm⁻¹) from a Milli-Q
8 water purification system (Millipore, MA, USA), and 3% HCl was added for better dissolution of
9 SeCys₂ and SeMeSeCys. Inorganic selenium solutions were prepared by dissolving sodium selenite
10 (Na₂SeO₃) and selenate (Na₂SeO₄) (Merck) in Milli-Q water. Stock solutions were stored at 4°C,
11 whereas working standard solutions were prepared daily by dilution.

12

13

14 *Statistical analysis*

15

16 The data was analysed using analysis of variance (ANOVA) in the GLM procedure of SAS version
17 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Significantly different means between samples were analysed
18 with Tukey HSD tests.

19

1 **Results**

2

3 *Plant growth and development*

4

5 Plant growth and senescence was monitored by measuring dry weight accumulation up to 14 days
6 of Se application and by recording the rate of development (BBCH, data not shown) and
7 chlorophyll content of senescing leaves (SPAD value, data not shown) until maturity. The results
8 showed that even a very high Se accumulation in leaves ($33 \mu\text{g Se g}^{-1}$) (Table 3) did not delay the
9 development of plants. Also, no significant alterations in leaf senescence were observed in SPAD
10 values. After 14 days of application, Se treatment had decreased the DM accumulation from 4.1 g
11 DW plant^{-1} in control plants to $3.6 \text{ g DW plant}^{-1}$ (-11%) in plants treated with $65 \mu\text{M Se plant}^{-1}$ in
12 soil (Figure 1). In general, foliar application of SeIV resulted in more significant decrease in DM
13 accumulation the reduction being -18% and -28% in SeIV and Se65/SeIV treated plants,
14 respectively. However, the reduction in DM accumulation seemed to be transient since eventually
15 Se application had a slightly positive impact on seed yield (from $+1$ to $+10\%$) (Figure 1). Selenium
16 treatment did not alter the plant architecture which could be observed as similar development of
17 yield components in all treatments (Table 2). Selenium treatment tended, however, to decrease the
18 number of side rachises.

19

20

21 *Activation of gene expression*

22

23 Activation of the key genes of sulphur metabolism (*APS1*, *APS2* and *APS3*) as well as gene
24 homologue responsible for the synthesis of SeMeSeCys, *SMT*, was followed in the leaves of *B.*
25 *napus* plants after 6 hours, 7 or 14 days of Se supplementation. In general, the expression of *APS1*

1 was enhanced the most and over 5-fold increase in transcript levels were detected (Figure 2a). The
2 transcript accumulation of *APSI* tended to be faster in plants which had been treated with foliar
3 SeVI or SeIV. In those plants, a 4 – 5 fold increase was detected after 7 days of application whereas
4 in plants given Se65 in soil the expression peaked after 14 days of the treatment. Foliar application
5 of SeVI resulted in 5.5 – fold increase in *APSI* expression levels whereas SeIV only 3 – fold. When
6 SeVI was applied to soil, these differences in foliar treatments diminished. Alterations in the
7 expression of *APS2* and *APS3* were more modest but a 4 – fold increase in *APS2* transcript levels
8 were detected after 14 days of Se treatment after foliar SeIV or soil SeVI applications (Figure 2b).
9 The form of Se did not affect the transcript accumulation of *APS3* (Figure 2c). A 2 – 2.5-fold
10 increase in the expression of *SMT* homologue was detected in plants treated with 65 mM of Se (VI)
11 in soil, and the expression seemed to decrease if a foliar spray of Se(VI) or Se(IV) was applied
12 simultaneously (Figure 2d).

13
14 A partial *SMT* homologue of *B. napus* was cloned and the translated protein sequence was aligned
15 with corresponding sequences of Se accumulator *A. bisulcatus* and non-accumulator *B. oleraceae*
16 (Figure 3). The result shows that amino acid alteration of Ala-184 to Thr specific to Se non-
17 accumulators was found in *B. napus* *SMT* protein homologue. In addition, the *SMT* protein
18 sequence of *B. oleraceae* and *B. napus* has higher homology compared to that of *A. bisulcatus*.

21 *Identification of selenium species in leaves and seeds*

22
23 Se species analysis revealed the dynamics of Se assimilation in *B. napus* leaves (Figure 4). After 6
24 hours of SeVI supplementation in soil, 81 % of the Se was in leaves in inorganic form as SeVI. The
25 proportion of inorganic SeVI decreased to 60 % in 14 days. In parallel, the inorganic SeIV was

1 detected after 7 days, being significant after 14 days supplementation probably due to the intensive
2 activation of *APS* genes (Figure 2) and accumulation of SeIV as an intermediate product of Se
3 assimilation. Simultaneously, the total Se content continued to increase from 18.72 to 33.00 $\mu\text{g g}^{-1}$
4 indicating that there was still Se available in soil for plant uptake (Table 3). It also indicates that the
5 assimilation of Se in organic compounds is efficient in *B. napus* as the proportion of SeMet
6 increased from 15 to 33 % after 6 hours or 14 days of application, respectively. SeMeSeCys
7 accumulation was detected already 6 hours after application and coincided with a 2 – fold increase
8 of *SMT* gene expression (Figure 2d). Although the *SMT* expression remained elevated, SeMeSeCys
9 content decreased in time and after 14 days no SeMeSeCys was found (Figure 4, Table 3).

10

11

12 The foliar spray of SeVI or SeIV resulted in rapid accumulation of Se in leaves. As expected, after 6
13 hours of application the main forms of inorganic Se were SeVI and Se(IV) in SeVI treated and in
14 SeIV treated plants, respectively (Figure 5a, b), After this period of time, the concentration of
15 inorganic selenium decreased with time due to its biotransformation to Se organo compounds, in
16 particular to SeMet and its oxidation product, selenomethionine selenium oxide, (SeOMet). In seeds
17 and meal, however, the main Se species was SeMet and as other Se species only traces of SeOMet
18 was detected (Figures 6-7).

19

20

21 *Accumulation of Se species*

22

23 Selenium uptake was very fast and after 6 hours of soil application (Se 65 μM) 18.72 $\mu\text{g Se g}^{-1}$ had
24 accumulated in the leaves (Table 3). Simultaneous foliar Se application of SeIV increased the total
25 Se content faster than SeVI. Selenium was also more rapidly biotransformed to SeMet in SeIV

1 treated plants which could be seen as higher SeMet content after 6 hours of application (both 0 and
2 65/SeVI and SeIV). After 7 days SeMet content of 0/SeVI and 0/SeIV plants was decreased
3 probably due to plant growth and biomass accumulation (Figure 1) and restricted availability of
4 SeVI and SeIV for SeMet biosynthesis. In general, the Se accumulation in plants applied with foliar
5 spray of SeVI or Se IV was low compared to those treated with Se in soil (Table 3). Foliar spray
6 seemed to interfere Se uptake and SeMet synthesis as the Se content in 65/SeVI and 65/SeIV plants
7 was lower than in plants which had given Se only to soil (Se 65 μM). Moreover, significantly lower
8 SeMet contents were measured after 7 days in 65/SeVI ($2.04 \mu\text{g SeMet g}^{-1}$) and 65/SeIV ($5.54 \mu\text{g}$
9 Se SeMet g^{-1}) compared to Se 65 plants ($7.03 \mu\text{g SeMet g}^{-1}$). The expression of *APSI* homologue
10 peaked earlier (7 days) in plants treated with foliar Se compared to 65/0 plants (14 days) (Figure
11 2a). Once foliar SeVI or SeVI was applied together with soil SeVI application, the *APSI* expression
12 was decreased radically and may in part explain the lower SeMet contents of 65/SeVI and 65/SeIV
13 plants (Table 3).

14

15 As seen in chromatographic profiles, SeMet was the main organic Se compound in leaves (Figure 4
16 and 5) and the proportion of it from all Se species varied significantly between treatments and
17 sampling times (from 12 to 71 %) (Table 3). Accumulation of SeMeSeCys (2 to 4 % of total Se)
18 was detected in the leaves 6 hours after soil application of Se. The SeMeSeCys content decreased in
19 time being 1 – 2% and 0 – 2% of total Se after 7 and 14 days respectively. The expression of *SMT*
20 homologue was rapidly up-regulated after 6 hours of 0/SeVI and soil Se treated plants (Figure 2d)
21 but the expression level did not clearly correlate with the detected SeMeSeCys contents (Table 3).

22 Selenium application to soil resulted in high accumulation of total Se and SeMet in seeds and
23 protein rich meal (Table 4). Actually up to 94 % of Se found in meal was SeMet. Although the
24 content of inorganic Se species was high in the leaves nor inorganic SeVI or SeIV was detected in
25 seeds.

1 Discussion

2

3 In the literature accumulating results on the effects of Se on plant growth and yield formation are
4 somewhat contradictory. Selenium feeding improved the seed set in our experiment which was in
5 accordance with earlier results on *B. napus* by Lyons et al. (2009). In field experiments, however,
6 yield increases as a result of Se application have not been observed in *Brassica* (Lyons et al. 2009,
7 Seppänen et al. 2010). The required Se content for plants may be lower than obtained under many
8 experimental conditions as the impurities in chemicals and especially from atmosphere as
9 volatilized Se-compounds may be adequate to support normal growth (Terry et al. 2000). In other
10 plant species, at low concentrations Se has been shown to enhance plant growth and DM
11 accumulation (Hartikainen and Xue 1999; Xue et al. 2001) or have no effect (Hartikainen et al.
12 1997, Djanaguiraman et al., 2010).

13

14 Selenium concentrations above certain threshold can cause growth reduction already without any
15 symptoms of toxicity (Lyons et al., 2005). The threshold for DM reduction is dependent on plant
16 species, chemical form of applied Se as well as on the availability of S in growth media (Lyons et
17 al., 2005, Terry et al., 2000). Andrew & Hegarty (1969) have defined 10 % reduction in DM
18 accumulation as a critical nutrient concentration for toxicity. Lyons et al., (2005) calculated in
19 greenhouse experiments $325 \mu\text{g Se g}^{-1} \text{DM}$ (by using Se application of $2.6 \text{ mg kg}^{-1} \text{ soil}$) as a critical
20 Se concentration for wheat. In our experiment Se treatments resulted in transient -3 to -28 %
21 reductions in leaf DM accumulation after 14 days of application when Se accumulated rapidly in
22 plant tissue and the biotransformation to organic compounds was activated. The growth retardation
23 may have been due to metabolic disturbance caused by the rapid accumulation of inorganic Se and
24 conversion to organic compounds such as SeMet. Selenite, which is known to be more rapidly

1 biotransformed to selenoamino acids than SeVI (Sors et al., 2005a), caused more severe reduction
2 in *B. napus* growth.

3
4 The non-specific incorporation of selenoaminoacids into proteins and active sites of enzymes such
5 as glutathione peroxidase (GPX), contributes to Se toxicity in Se non-accumulating species (Brown
6 and Shrift 1981). In hyperaccumulators the increased Se flux through S assimilation pathway and
7 prevention of Se incorporation into proteins is an important Se tolerance mechanism. In
8 hyperaccumulators *A. bisulcatus* (Sors et al., 2009) and *S. pinnata* (Freeman et al., 2010)
9 mechanisms of Se-tolerance include constitutive high expression of *SMT* gene and high
10 accumulation of non-protein SeMeSeCys. Also the SMT enzyme activity correlates with Se-
11 methylcysteine (MeCys) and SeMeSeCys accumulation and Se tolerance (Sors et al., 2005b). On
12 the contrary, the main form of Se accumulation in secondary accumulator *S. albescens* was Se-
13 cystathione (Se-Cyst), a metabolic intermediate between SeCys and SeMet (Freeman et al., 2010).
14 The results on our *SMT*-gene sequencing and Se speciation analysis show that the Se metabolism of
15 *B. napus* resembles that of Se non-accumulators and secondary accumulators. At early stages of the
16 development even 90 % of Se can be incorporated in non-protein amino acids such as SeMeSeCys
17 in *A. bisulcatus* (Pickering et al., 2000, Pickering et al., 2003). In our experiments, up to 4 % of Se
18 was found as SeMeSeCys in *B. napus* 6 hours to 7 days after Se application. In non-accumulating
19 *Astragalus* species 4 to 14 % of total Se is bound in non-protein amino acids (Sors et al., 2005). The
20 moderate accumulation of SeMeSeCys in *B. napus* indicates that the incorporation of excess Se in
21 to non-protein amino acids is not efficient and thus, the transient growth retardation was detected as
22 the tissue Se content exceeded certain threshold.

23
24 The predicted partial SMT protein sequence of *B. napus* revealed homology to non-accumulating
25 species *Astragalus drummondii*, *Astragalus crassicarpus* and *Astragalus leptocarpus* in having

1 tyrosine (Tyr) residue at position 148 instead of phenylalanine (Phe) (Sors et al., 2009). Moreover,
2 the Ala-184 Thr substitution indicates that the SMT enzyme in *B. napus* has no substrate specificity
3 to SeCys but rather it has a dual SMT/HMT (homocysteine methyltransferase HMT EG 2.1.1.10)
4 function and has ability to methylate both SeCys and HoCys (homocysteine). *A. bisulcatus* AbSMT
5 has high homology with the coding region of HMT enzyme, but due to Ala in position 184 appears
6 to be specific for the methylation of SeCys and lack the ability to methylate HoCys (Sors et al.,
7 2009). Flowering plants have a S-methylmethionine (SMM) cycle, where SMM is synthesized from
8 Met, converted to S-adenosylmethionine (AdoMet) and again back to Met. The last conversion step
9 back to Met is catalyzed by HMT (Mudd and Datko 1990, Ranocha et al., 2001). In non-
10 accumulators, the SMT/HMT dual function may provide an alternative pathway for methylation of
11 SeCys and HoCys and play unique role in plant Se and S metabolism (Lyi et al. 2007). The dual
12 SMT/HMT function in *B. napus* may contribute to the low level of SeMeSeCys and high SeMet
13 accumulation that was observed in this study and in case of SeMet also in our earlier studies
14 (Seppänen et al. 2010). It has to be also noted that SeCys, a substrate for SeMeSeCys synthesis was
15 not detected after Se application when significant amounts of SeMet was synthesized in leaf tissue.

16
17 In *B. napus* a 1.5 – 2 fold increase in *SMT* transcript accumulation was detected already after 6 h of
18 soil SeVI application. Lyi et al., (2007) showed that in *Brassica oleraceae* *BoSMT* gene expression
19 responded to applied SeVI whereas the highly homologous *BoHMT* was up-regulated by S status
20 and to a lesser extent by Met, SMM, homocysteine or cadmium. In *Arabidopsis* *HMT2* gene was
21 activated by SeVI (Zhang et al., 2006) suggesting to a detoxification of SeCys via methylation to
22 prevent the incorporation into proteins (DeLuc et al., 2004). Methylated SeCys was not, however,
23 detected in those plants indicating to low abundance of the compound in *Arabidopsis*. The
24 accumulating organic Se-species in our experiment were SeMet, SeOMet and SeMeSeCys which
25 were the compounds also accumulating in wheat during short 24 h feeding with SeVI or SeIV (Li et

1 al., 2007). In *B. napus* no SeCys nor methylated SeCys was detected in SeVI treated plants. The
2 result suggests that neither the synthesis of SeCys nor the methylation of SeCys are the main
3 detoxification mechanisms of Se in *B. napus* or these molecules are labile and lost during extraction
4 and detection by HPLC-ICP-MS. The transient accumulation of SeMeSeCys and elevated *SMT*
5 transcription levels indicate that SeVI activates the synthesis of non-protein Se-amino acids in *B.*
6 *napus*, but the capacity of this Se detoxification pathway may be limited.

7
8 ATPS is a key enzyme of sulfate assimilation pathway in plants (Leustek and Saito 1999) which can
9 also be activated by SeVI (Renosto et al., 1993). The importance of ATPS and *SMT* activity on Se
10 metabolism has been verified by using transgenic approaches. Pilon-Smits et al., (1999) showed that
11 the overexpression of *APSI* in *B. juncea* increases SeVI reduction as well as Se accumulation by
12 two-threefold. Also, the transgenic plants were more tolerant to Se. Overexpression of *SMT* also
13 increases Se tolerance and accumulation in *Arabidopsis* and *B. juncea* by detoxifying SeCys by
14 incorporating it into non-protein SeMeSeCys (LeDuc et al., 2004). Higher Se accumulation was
15 obtained in double transgenic *B. juncea* overexpressing both *SMT* and *APS* indicating that reduction
16 of SeVI by *APS* was the rate limiting step for Se assimilation (LeDuc et al., 2006).

17
18 Selenium activates the expression of genes on S assimilation pathway as it mimics S starvation in
19 plants (Terry et al., 2000, Freeman et al., 2010). The activation of S assimilation pathway by SeVI
20 differ between the two hyperaccumulators so that in *S. pinnata* S assimilating genes are
21 continuously up-regulated indicating that it has lost the ability to sense SeVI (Freeman et al., 2010)
22 whereas in *A. bisulcatus* and secondary accumulator *S. albescens* (Freeman et al., 2010), the
23 expression genes associated with S assimilation are induced by SeVI. *S. albescens* and *B. napus*,
24 which belong to *Brassicaceae* genus, are both classified as secondary accumulators of Se. *S.*
25 *albescens* growing in 20 μ M SeVI solution exhibited Se toxicity symptoms while accumulating up

1 to 500 $\mu\text{g Se g}^{-1}$ DW in 16 weeks. In *S. pinnata*, Se accumulation continued through entire 16
2 weeks growing period resulting in approx. 3000 $\mu\text{g Se g}^{-1}$ DW (Freeman et al., 2010). In our
3 experiment *B. napus* accumulated up to 33 $\mu\text{g Se g}^{-1}$ DW in one week while growing in 65 $\mu\text{M SeVI}$
4 solution. The rate of Se accumulation was comparable with *S. albescens* which had accumulated
5 approx. 15 $\mu\text{g Se g}^{-1}$ DW after one week (Freeman et al., 2010). In *B. napus* the expression of S
6 assimilating genes was activated by SeVI and SeIV applications similarly to *S. albescens*. Already
7 after 6 hours of soil SeVI application a 1.5 to 2 – fold increase in *APS1-3* and *SMT* transcript
8 accumulation was detected. *APS1* responded most to applied Se showing up to 5-fold increase in the
9 transcript levels 7 d after application. In *Arabidopsis* the transcriptome analysis of SeVI treated
10 plants revealed a 5.9 and 0.25 –fold increase in *APS3* and *APS4* expression, respectively (Van
11 Hoewyk et al., 2008) whereas in *S. pinnata* *APS1* and *APS2* were constitutively up-regulated in
12 roots (Freeman et al. 2010). On the contrary in *Arabidopsis* *APS1* was not affected by SeVI or SeIV
13 treatments (Zhang et al., 2006). The amount and chemical form of applied Se as well as the feeding
14 time varies in these expression studies which can in turn explain why different isoforms of *APS*
15 genes are activated.

16
17 In *B. napus* soil SeVI was rapidly taken up and assimilated to SeMet. After 6 h of SeVI application
18 15 % of total Se was already biotransformed to SeMet. High rate of Se assimilation continued
19 through experiment and after 14 d 33 % of total Se was found as SeMet. Simultaneously the level of
20 inorganic SeVI decreased from 81% (6 h) to 60% (14 d). When SeVI or SeIV was applied to leaves,
21 significantly lower accumulation of SeMet was detected. SeOMet accumulated only in plants
22 treated with foliar Se. In wheat, a short 24 h feeding with SeVI and SeIV resulted in low
23 accumulation of SeMet, SeOMet and SeMeSeCys in roots (Li et al., 2007). Interestingly, foliar
24 applied SeVI or SeIV seemed to interfere root SeVI uptake. Similar results have been obtained in
25 wheat where soil applied SeIV suppressed SeVI uptake by roots (Li et al., 2007).

1

2 In seeds and protein-rich meal fraction SeMet was the main Se-compound. Up to 67 and 94 % of
3 total Se was in form of SeMet in seeds and meal, respectively. In field experiment the proportion of
4 SeMet was also high ranging from 65 to 100 % in the seeds of *B. napus* (Seppänen et al., 2010). In
5 this experiment the Se content of seeds was 5 to 10 –fold and yet, the proportion of SeMet from
6 total Se was high. This indicates that the synthesis of SeMet in *B. napus* seems to be efficient and
7 that seeds are a strong sink for SeMet. Whether SeMet in seeds is incorporated in storage proteins
8 or it is as free amino acid is not known.

9

10 In SeVI and SeIV leaves, seeds and meal SeOMet is also detected. SeOMet is a SeMet oxidation
11 product randomly produced by factors inherent to the analytical process such as: sampling, storage
12 and sample treatment. One of the main problems related with Se speciation is the lack of available
13 Se compound standards that makes it difficult to identify each individual species. In addition, the
14 hardly retained selenocompounds can easily co-elute from a chromatographic column leading to
15 erroneous identification. A proper identification of the peaks implies the application at least of two
16 chromatographic columns with different separation mechanisms. In order to assess a correct
17 identification of Se-peaks, all speciation studies were conducted by using two columns: an anion
18 exchange column (PRP X-100) and a Shodex Asahipak column, that combines size exclusion and
19 ion exchange mechanisms were utilized. Because of that, Se speciation measurements were
20 performed by using both separation mechanisms and the presence of SeMetO and SeMet is
21 unambiguously confirmed by the application of both chromatography techniques.

22

23 We conclude that Se activates S assimilation pathway rapidly in *B. napus*. The intensive Se uptake
24 causes transient growth retardation, activation of Se detoxification followed by modest synthesis of
25 a non-protein SeMeSeCys. The SMT enzyme in *B. napus* carries a Ala-184 Thr mutation causing a

1 SMT/HMT dual function of the enzyme and may explain the low accumulation of SeMeSeCys.
2 Also, the main organic Se compound accumulating in the leaves and seeds was SeMet and the
3 substrate for SeMeSeCys synthesis, SeCys, was not detected. Transient accumulation of methylated
4 Se compounds indicate that the volatilization of Se compounds may be activated and function as a
5 detoxification mechanism in *B. napus*.

6

7 **Acknowledgements**

8

9 Emil Aaltonen Foundation, Aino and August Tiura Foundation and Tor and Maj Nessling
10 Foundation, Raisio Ltd., Yara Suomi Ltd. are acknowledged for their financial support. The
11 Complutense University group thanks to the Spanish Commission of Science and Technology
12 (CTQ-2011-22732)) and the Comunidad Autonoma de Madrid (Spain) and European funding from
13 FEDER program (project S2009/AGR-1464, ANALISYC-II). COST FA0905 Mineral-improved
14 crop production for healthy food and feed is acknowledged for providing platform for the
15 collaboration between the laboratories.

16

17

1 **References**

- 2
- 3 Andrew CS, Hegarty MA. 1969. Comparative responses to manganese excess of eight tropical and
4 four temperate pasture legume species. *Australian Journal of Agricultural Research*. 20, 687-696.
- 5 Bañuelos GS, Ajwa HA, Mackey M, Wu L, Cook C, Akohoue S, Zambruski S. 1997. Evaluation of
6 different plant species used for phytomediation of high soil selenium. *Journal of Environmental*
7 *Quality* 26, 639-646.
- 8 Bañuelos GS, Mayland HF. 2000. Absorption and distribution of selenium in animals consuming
9 canola grown for selenium phytoremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 322-
10 328.
- 11 Brown TA, Shrift A. 1981. Exclusion of selenium from proteins in selenium-tolerant *Astragalus*
12 species. *Plant Physiology* 67, 1951-1953.
- 13 Djanaguiraman, M., Prasad P.V.V, Seppänen M. 2010. Selenium protects sorghum leaves from
14 oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defence system. *Plant*
15 *Physiology and Biochemistry* 48, 999-1007.
- 16 Ellis DR and Salt DE (2003) Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology*
17 6, 273-279.
- 18 Eurola M, Alfthan G, Ekholm P, Root T, Suoniitty T, Venäläinen ER, Ylivainio K. 2011.
19 *Seleenityöryhmän raportti 2011. MTT Raportti* 35, 34 p.
- 20 Freeman JL, Tamoki M, Stushnoff C, Quinn CF, Cappa JJ, Devonshire J, Fakra SC, Marcus MA,
21 McGrath SP, Van Hoewyk D, Pilon-Smits AH. 2010. Molecular mechanisms of selenium tolerance
22 and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. *Plant Physiology* 153, 1630-1653.
- 23 Hartikainen H. 2005. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human
24 health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 18, 309-318.
- 25 Hartikainen H, Ekholm P, Piironen V, Xue T, Koivu T, Yli-Halla M. 1997. Quality of the ryegrass
26 and lettuce yields as affected by selenium fertilization. *Agricultural and Food Science in Finland* 6,
27 381- 387.
- 28 Hartikainen H, Xue T. 1999. The promotive effect of selenium on plant growth as triggered by UV
29 irradiation. *Journal of Environmental Quality* 28, 1372-1375.
- 30 Hoewyk D, van Takahashi H, Inoue E, Hess A, Tamaoki M, Pilon-Smits E. A. H. 2008.
31 Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance
32 mechanisms in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum* 132, 236-253.

1 Kumpulainen J, Raittila A-M, Lehto J, Koivistoinen P. 1983. Electrochemical atomic absorption
2 spectrometric determination of selenium in foods and diets. *Journal of Association of Official*
3 *Analytical Chemists*. 66, 1129-1135.

4 LeDuc DL, AbdelSamie M, M6ntes-Bayon M, Wu CP, Reisinger SJ, Terry N. 2006.
5 Overexpression of both ATP sulfurylase and selenocysteine methyltransferase enhances selenium
6 phytomediation traits in Indian mustard. *Environmental Pollution* 144, 70-76.

7 LeDuc DL, Turun AS, M6ntes-Bayon M, Meija J, Malit MF, Wu CP, AbdelSamie M, Chiang C-Y,
8 Tagmount A, deSouza M, Neuhierl B, B6ock A, Caruso J, Terry N. 2004. Overexpression of
9 selenocysteine methyltransferase in *Arabidopsis* and indian mustard increases selenium tolerance
10 and accumulation. *Plant Physiology* 135, 377-383.

11 Leustek T, Saito K. 1999. Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology* 120, 637-
12 643.

13 Li HF, McGrath SP, Zhao FJ. 2008. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat
14 supplied with SeVI and selenite. *New Phytologist* 178, 92-102.

15 Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time
16 quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods* 25(4), 402-408.

17 Lyi SM, Zhou X, Kochian LV, Li L. 2007. Biochemical and molecular characterization of the
18 homocysteine S-methyltransferase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Phytochemistry*
19 68, 1112-1119.

20 Lyons GH, Stangoulis JCR, Graham RD. 2005. Tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) to high
21 soil and solution selenium levels. *Plant and Soil* 270, 179-188.

22 Lyons GH, Gene Y, Soole K, Stangoulis JCR, Liu F, Graham RD. 2009. Selenium increases seed
23 production in Brassica. *Plant and Soil* 318, 73-80.

24 Mudd SH, Datko AH. 1990. The S-methylmethionine cycle in *Lemna paucicostata*. *Plant*
25 *Physiology* 93, 623-630.

26 Neuhierl B, Bock A. 1996. On the mechanisms of selenium tolerance in selenium-accumulating
27 plants: purification and characterization of a specific selenocysteine methyltransferase from
28 cultured cells of *Astragalus bisulcatus*. *European Journal of Biochemistry* 239, 235-238.

29 Pederero Z, Madrid Y. 2009. Novel approaches for selenium speciation in food stuffs and
30 biological specimens. *Analytica Chimica Acta* 634, 135-152.

31 Pederero Z, Elvira D, C6mara C, Madrid Y. *Analytical Chimica Acta* 596 (2007) 251-256

1 Pickering IJ, Prince RC, Salt DE, George GN. 2000. Quantitative, chemically specific imaging of
2 selenium transformation in plants. Proceeding of National Academic of Science of Unated State of
3 America 97, 10717-10722.

4 Pickering IJ, Wright C, Bubner B, Ellis D, Persans MW, Yu EY, George GN, Prince RC, Salt DE.
5 2003. Chemical form and distribution of selenium and sulfur in the selenium hyperaccumulator
6 *Astragalus bisulcatus*. Plant Physiology 131, 1-8.

7 Pilon-Smits EAH, Hwang S, Lythe CM, Zhu Y, Tai JC, Bravo RC, Chen Y, Leustek T, Terry N.
8 1999. Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard leads to increased SeVI uptake,
9 reduction, and tolerance. Plant Physiology 119, 123-132.

10 Rayman M. 2008a. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. British Journal
11 of Nutrition 100, 238-253.

12 Rayman M. 2008b. Food-chain selenium and human health: emphases on intake. British Journal of
13 Nutrition 100, 254-268.

14 Ranocha P, Bourgis F, Ziemak MJ, Rhodes D, Gage DA, Hanson AD. 2001. The S-
15 methylmethionine cycle in angiosperms: unicity, antiquity and activity. Plant Journal 25, 575-584.

16 Renosto F, Hamang CP, Martin RL, Thomassian C, Zimmerman G, Segel H. 1993. ATP sulfurylase
17 from higher plants: kinetic and structural characterization of the chloroplast and cytosol enzymes
18 from spinach leaf. Archives of Biochemistry and Biophysics 307, 272-285.

19 Seppänen MM, Kontturi J, Lopez Heras I, Madrid Y, Camara C, Hartikainen H. 2010. Agronomic
20 biofortification of *Brassica* with Selenium – enrichment of SeMet and its identification in *Brassica*
21 seeds and meal. Plant and Soil 337, 273–283. DOI 10.1007/s11104-010-0523-y.

22 Sors TG, Ellis DR, Salt DE. 2005a. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate
23 in plants. Photosynthesis Research 86, 373-389.

24 Sors TG, Ellis DR, Na GN, Lahner B, Lee S, Leustek T, Pickering IJ, Salt DE. 2005b. Analysis of
25 sulfur and selenium assimilation in *Astragalus* plants with varying capacities to accumulate
26 selenium. Plant Journal 42, 785-797.

27 Sors TG, Martin CP, Salt DE. 2009. Characterization of selenocysteine methyltransferases from
28 *Astragalus* species with contrasting selenium accumulation capacity. Plant Journal 59, 110-122.

29 Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS. 2000. Selenium in higher plants. Annual Review of
30 Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51, 401-432.

31 Vauclare P, Kopriva S, Fell D, Suter M, Sticher L, von Ballmoos P, Krähenbühl U, Op den Camp
32 R, Brunold C. 2002. Flux control of sulphate assimilation in *Arabidopsis thaliana* adenosine 5'-
33 phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control of thiols.
34 Plant Journal 31, 729-740.

- 1 White PJ, Broadley MR, 2009. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking
2 in human diets: iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist* 182,
3 49-84.
- 4 Xue T, Hartikainen H, Piironen V. 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on
5 senescing lettuce. *Plant and Soil* 237, 55-61.
- 6 Zhang L-H, Abdel-Ghany SE, Freeman AR, Schiavon M, Pilon-Smits E.A.H. 2006. Investigation
7 of selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 128, 212-223.
- 8 Zhu Y-G, Pilon-Smits E.A.H, Zhao F-J, Williams PN, Meharg AA. 2009. Selenium in higher
9 plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in Plant*
10 *Science* 14, 436-442.

Table 1. Instrumental operating conditions for LC and ICP-MS.

ICP-MS parameters	
Forward power	1250 W
Plasma gas flow rate	15 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	0.73 L min ⁻¹
Nebulizer gas flow rate	0.83 L min ⁻¹
Collision gas	93% He, 7% H
Collision gas flow rate	8.8 mL min ⁻¹
Nebulizer	Meinhard
Spray chamber	Impact Bead Quartz Spray
Isotope monitored	⁸⁰ Se, ⁷⁸ Se, ⁷⁶ Se and ⁷⁴ Se
Dwell time per point	200 ms
Replicates	3
HPLC parameters	
Anion exchange	
Column	Hamilton PRP-X100 (250 x 4.1 mm, 10 μm)
Mobile phase	0.2% citric acid, 2% methanol (pH 5)
Injection volume	100 μL
Flow rate	1 mL min ⁻¹
Column temperature	25 °C
Elution mode	Isocratic
Size exclusion anion exchange	
Column	Shodex Asahipak GS-220HQ (300 x 7.6 mm, 2 μm)
Mobile phase	25 mM ammonium acetate (pH 6.7)
Injection volume	100 μL
Flow rate	0.7 mL min ⁻¹
Column temperature	25 °C
Elution mode	Isocratic

Table 2. Plant weight (g DW), height (cm) and number of the main yield components in *Brassica napus* plants after 14 days of supplementation with 0 or 65 μM ($130 \mu\text{g Se plant}^{-1}$) as Na_2SeO_4 (Se VI) in soil and 0 or 100 μM ($30 \mu\text{g Se plant}^{-1}$) foliar spray of either Na_2SeO_4 (SeVI) or Na_2SeO_3 (Se IV). Total Se content of the plant is shown in Table 3.

	Height	Side rachimes	Siliques in main rachime	Siliques in side rachime
0	106.6	4.4	25.2	70.3
0/SeVI	101.3	3.7	29.1	67.1
0/SeIV	106.5	3.7	29.4	66.5
65	104.3	3.7	26.5	69.1
65/SeVI	102.1	3.5	27.4	67.1
65/SeIV	103.1	3.7	25.6	71.4
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Numbers followed by different letters in the same column differ significantly at the 5% level by Tukey's test; n.s. non significant. $n = 5$.

Figure 1. Dry matter accumulation (g) of *Brassica napus* treated with 0 or 65 μM ($130 \mu\text{g Se plant}^{-1}$) as Na_2SeO_4 (Se VI) in soil and 0 or 100 μM ($30 \mu\text{g Se plant}^{-1}$) foliar spray of either Na_2SeO_4 (SeVI) or Na_2SeO_3 (Se IV). DM accumulation of leaves was measured after 6 hours (white), 7 days (black) and 14 days (grey) of Se treatments and at maturity in harvested seeds (purple). Mean \pm SE, $n = 6$.

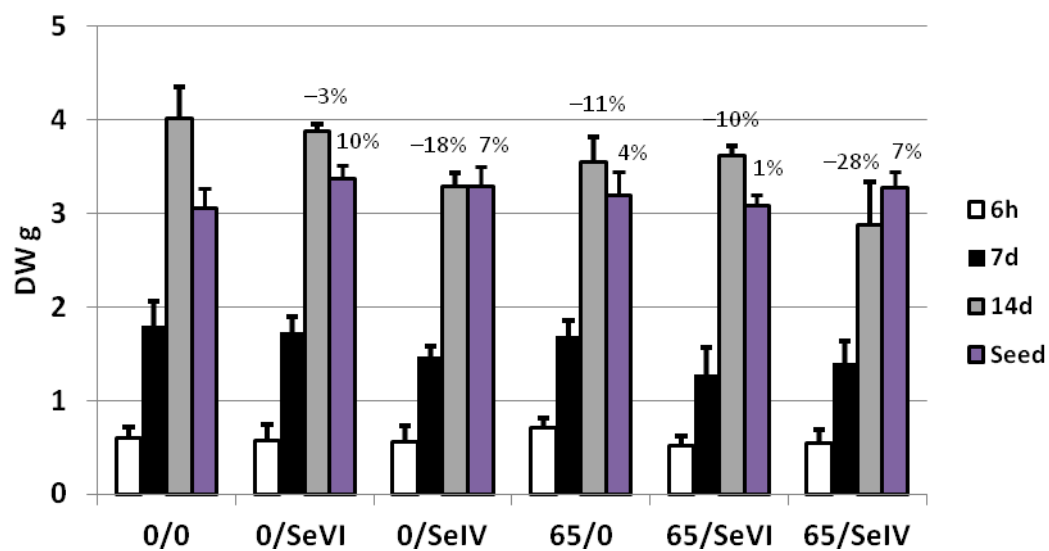


Figure 2. Relative expression of a) *APS1*, b) *APS2*, c) *APS3* and d) *SMT* genes after 6 hours (white), 7 days (black) or 14 days (grey) of supplementation with 0 or 65 μM ($130 \mu\text{g Se plant}^{-1}$) as Na_2SeO_4 (Se VI) in soil and 0 or 100 μM ($30 \mu\text{g Se plant}^{-1}$) foliar spray of either Na_2SeO_4 (Se VI) or Na_2SeO_3 (Se IV). Mean \pm SE, $n = 6$.

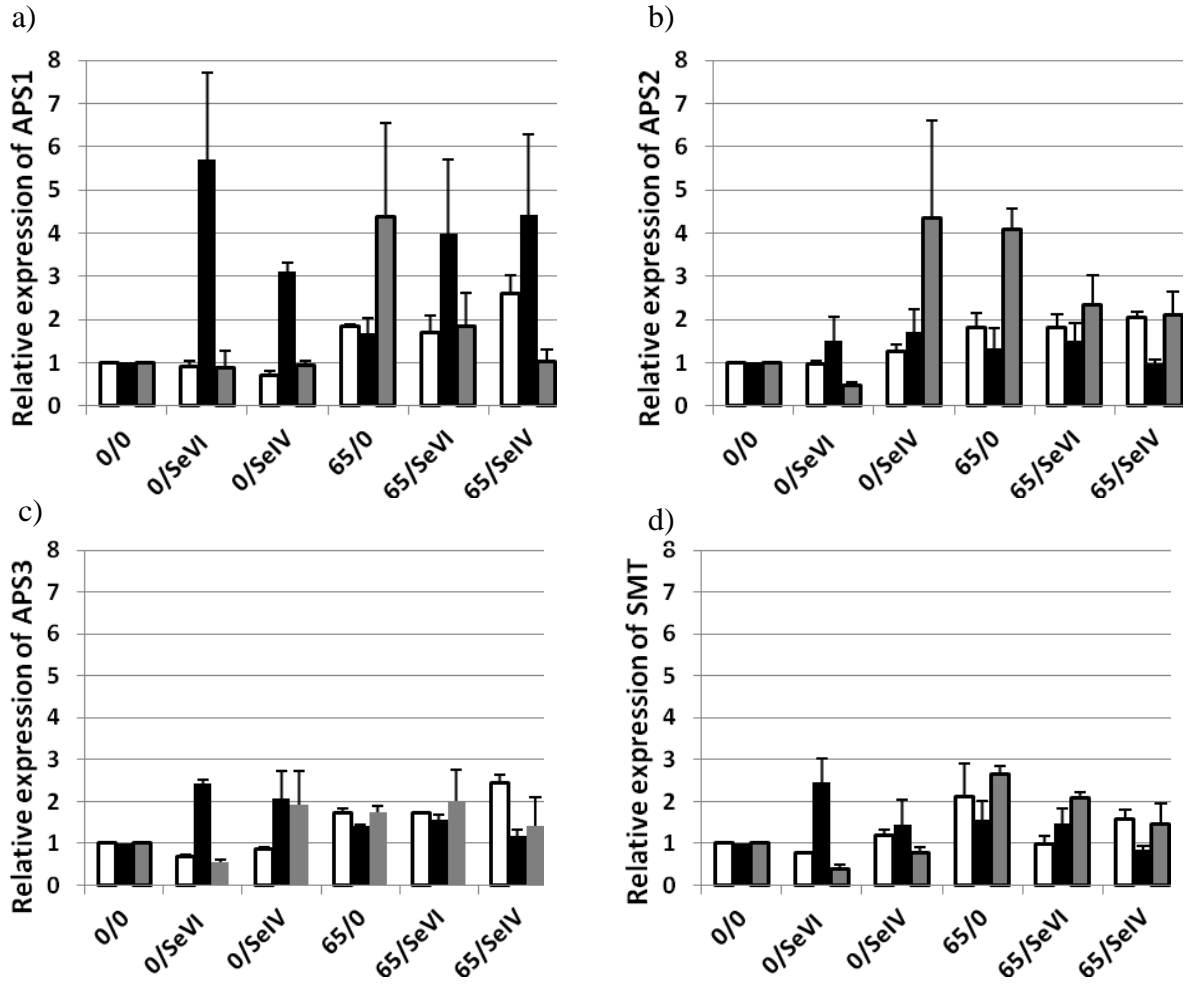


Figure 3. Partial protein sequence alignment of selenomethyltransferase (SMT) of *Brassica oleracea* (GenBank: AY817737.1), *Astragalus bisulcatus* (AJ131433.1) and putative SMT sequence of *Brassica napus*. The Ala-184 residue unique to Se accumulator and replacement by Thr residue in non-accumulators is bolded and indicated with an arrow.

```

                                     ↓
B. oleracea      TVHLDYLEAGADI ISSASYQATIQQFEAKGYSIEKSESLLRKSVEIACEARSTYYDKCKD
Astragalus     QVHLDYLENGADIIITASYQATIQQFKAKGFSDEEAGEALLRRSVEIAREARDLYYQRCAE
B. napus       -----SESLLRKSVEIACEARSTYYDKCKD

B. oleracea     D-----DDKKILKKRPILVAASVGSYGAF LADGSEYSGIYGDLITLET LKDFHRRRVQVL
Astragalus     SSSDNGDDSRILKQRPILIAGSVGSYGAYLADGSEFSGNYGDAIKSET LKDFHRRKVQIL
B. napus       D-----DDKKILKKRPILVAASVGSYGAF LADGSEYSGIYGDLITLET LKDFHRRRVQVL

                                     ▼
B. oleracea     AESGADI IAFETIPNKLEAQAF AELLDEGVAKIPGWFSFNSKDG VNVVSGDSIKECIAIA
Astragalus     ADGVDLLAFEAVPNKLEAQAYADLLEEENIITPAWFAFTSKDG NNVVSGDSIEECGSIA
B. napus       AESGADI IAFETIPNKLEAQ-----

```

Figure 4. Chromatographic profiles obtained by anion exchange LC-ICP-MS for ^{80}Se corresponding to enzymatic extraction of *B. napus* leaves after a) 6 hours, b) 7 days and c) 14 days of supplementation with $65\ \mu\text{M}$ ($130\ \mu\text{g Se plant}^{-1}$) as Na_2SeO_4 (Se VI) in soil. $n = 3$.

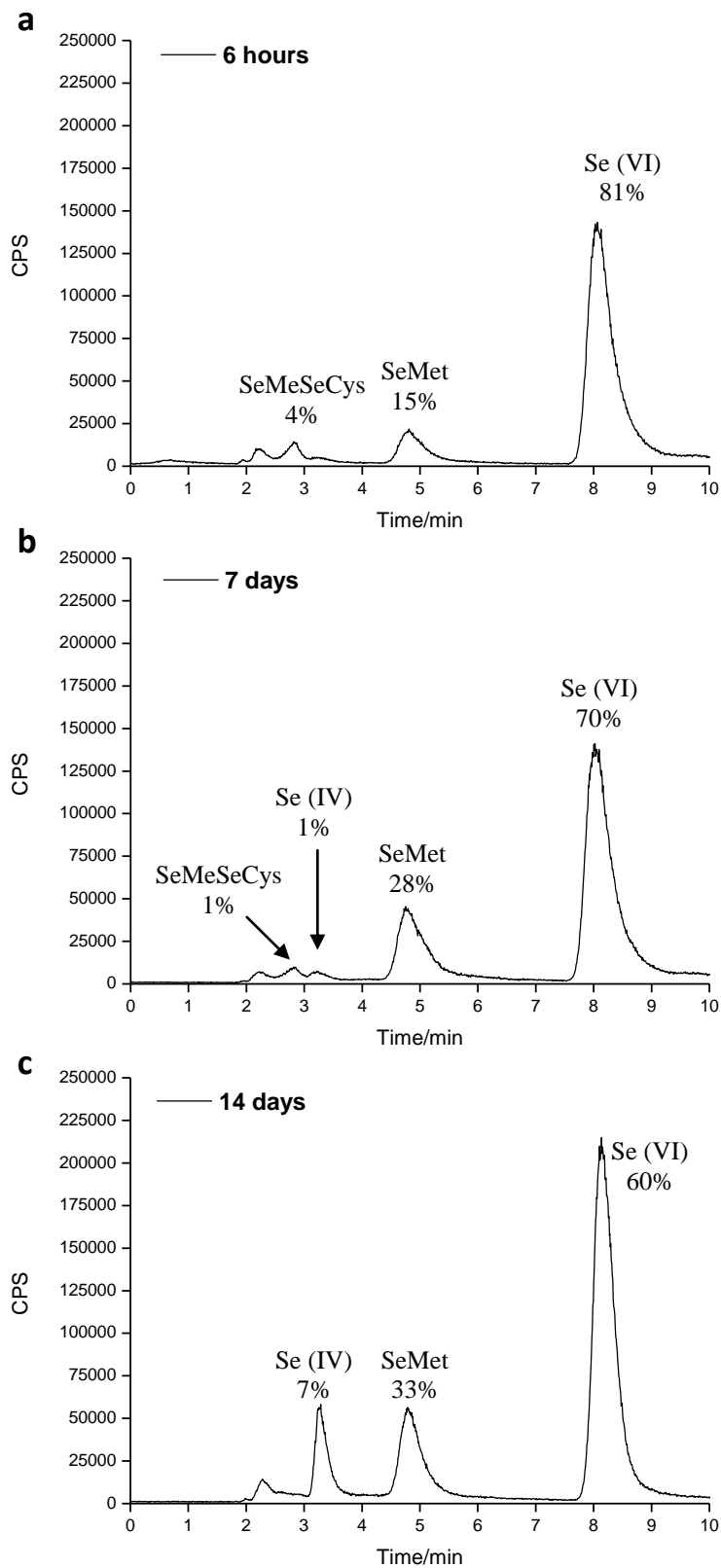


Figure 5. Chromatographic profiles obtained by anion exchange LC-ICP-MS for ^{80}Se corresponding to enzymatic extraction of the *B. napus* leaves supplemented with $100\ \mu\text{M}$ ($30\ \mu\text{g Se plant}^{-1}$) foliar spray of either a) Na_2SeO_4 (SeVI) or b) Na_2SeO_3 (Se IV) after 6 hours, 7 days or 14 days of supplementation. $n = 3$.

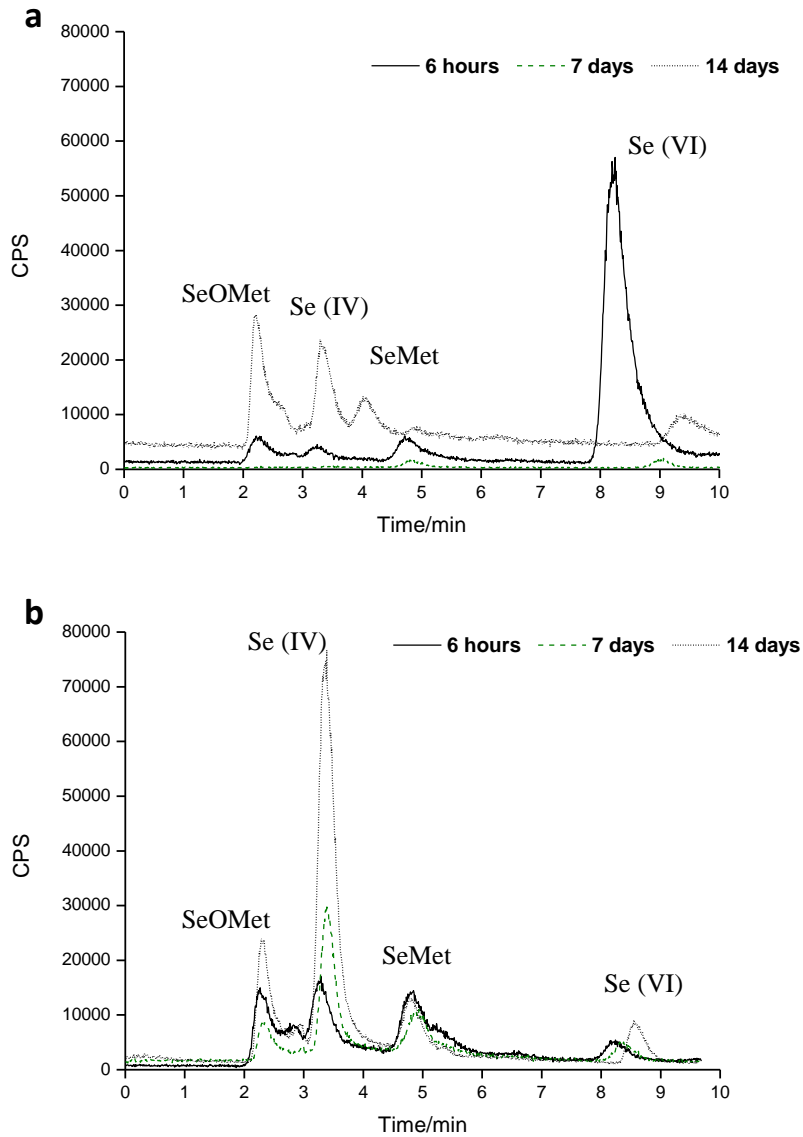


Table 3. Selenium content ($\mu\text{g Se g}^{-1}$) and Se species analysis of *Brassica napus* leaves 6 hours, 7 days or 14 days after supplementation with 0 or 65 μM ($130 \mu\text{g Se plant}^{-1}$) as Na_2SeO_4 (Se VI) in soil and 0 or 100 μM ($30 \mu\text{g Se plant}^{-1}$) foliar spray of either Na_2SeO_4 (SeVI) or Na_2SeO_3 (Se IV). Selenomethionine (SeMet), selenomethyl selenocysteine (SeMeSeCys) and inorganic SeVI and SeIV were detected. The recoveries (R%) have been calculated by comparing the sum of species with values of total Se obtained by acid digestion.

	Total Se	SeMet	SeMet %	Me SeCys	Me SeCys %	SeVI	SeVI %	SeIV	SeIV %	R %
6 h										
0	0.23f	0.10d	54b	0.00c	0c	0.07d	37d	0.04cd	9b	78c
0/SeVI	1.40e	0.11d	12e	0.00c	0c	0.84d	87a	0.01d	1de	70d
0/SeIV	2.40d	0.36d	71a	0.00c	0c	0.06d	2.5e	0.09c	0.18a	21f
65	18.72c	2.83b	15d	0.81a	4a	14.84a	80b	0.00d	0.00e	99a
65/SeVI	20.85b	2.05c	16d	0.26b	2b	10.06c	80b	0.26b	1de	61e
65/SeIV	23.04a	5.76a	29c	0.79a	4a	12.80b	64c	0.60a	3c	87b
7d										
0	0.15d	0.08d	49a	0.00d	0c	0.04d	24c	0.04d	27a	100b
0/SeVI	0.30d	0.07d	37c	0.00d	0c	0.12d	63a	0.00e	0e	65d
0/SeIV	0.30d	0.14d	41b	0.00d	0c	0.03d	9d	0.17b	49a	115a
65	22.15a	7.03a	33d	0.23a	1b	14.53a	66a	0.11c	1d	99bc
65/SeVI	15.60b	2.04c	33d	0.12b	2a	4.00c	64a	0.06d	1d	40e
65/SeIV	13.03c	5.54b	46a	0.06c	1b	6.15b	51b	0.37a	3c	93c
14 d										
0	0.13d	0.06d	46b	0.00b	0b	0.05d	36b	0.03d	17b	98ab
0/SeVI	0.27d	0.16d	59a	0.00b	0b	0.08d	30c	0.03d	11b	100ab
0/SeIV	0.63d	0.13d	20e	0.01b	2a	0.05d	8d	0.46c	70a	103a
65	33.00a	7.70a	29d	0.00b	0b	17.37a	64a	1.93a	7b	82c
65/SeVI	12.90c	4.02c	32c	0.25a	2a	8.00c	65a	0.13d	7b	96b
65/SeIV	22.03b	5.71b	32c	0.00b	0b	11.22b	61a	1.28b	7b	83c

Numbers followed by different letters in the same column differ significantly at the 5% level by Tukey's test; n.s. non significant. $n = 3$.

Figure 6. Chromatographic profiles obtained by anion exchange LC-ICP-MS for ^{80}Se corresponding to enzymatic extraction of the *B. napus* meal and seeds in plants supplemented with $65\ \mu\text{M}$ ($130\ \mu\text{g Se plant}^{-1}$) as Na_2SeO_4 (Se VI) in soil and $100\ \mu\text{M}$ ($30\ \mu\text{g Se plant}^{-1}$) foliar spray of Na_2SeO_4 (SeVI). $n = 3$.

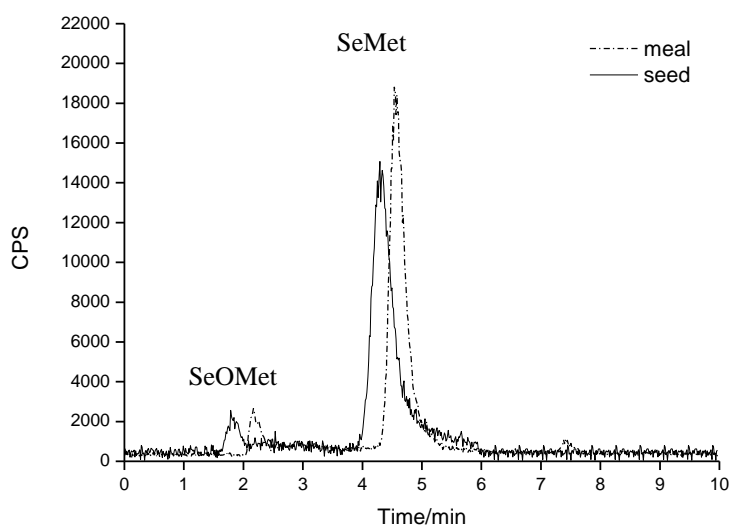


Figure 7. Chromatographic profiles obtained by size exclusion/anion exchange LC-ICP-MS for ^{80}Se corresponding to enzymatic extraction of the *B. napus* meal and seeds in plants supplemented with $65\ \mu\text{M}$ ($130\ \mu\text{g Se plant}^{-1}$) as Na_2SeO_4 (Se VI) in soil and $100\ \mu\text{M}$ ($30\ \mu\text{g Se plant}^{-1}$) foliar spray of Na_2SeO_4 (SeVI). $n = 3$.

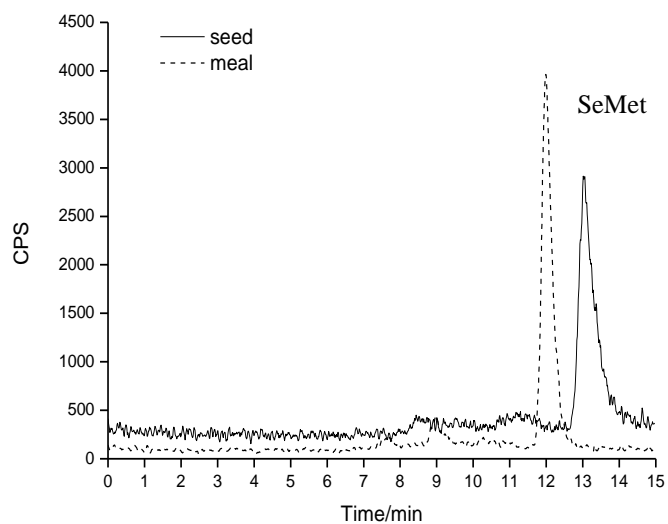


Table 4. Selenium content ($\mu\text{g Se g}^{-1}$) and Se specification analysis of *Brassica napus* seeds and meal in plants supplemented with 0 or 65 μM ($130 \mu\text{g Se plant}^{-1}$) as Na_2SeO_4 (Se VI) in soil and 0 or 100 μM ($30 \mu\text{g Se plant}^{-1}$) foliar spray of either Na_2SeO_4 (SeVI) or Na_2SeO_3 (Se IV). Selenomethionine (SeMet) and inorganic SeVI and SeIV were detected. The recoveries (R%) have been calculated by comparing the sum of species with values of total Se obtained by acid digestion.

	Total Se	SeMet	SeMet(%)	SeVI	R (%)
Seeds					
0	0.5 d	0 e		0.0	62b
0/SeVI	0.3 d	0.2 d	67	0.0	59 bc
0/SeIV	0.3 d	0.2 d	67	0.0	62 b
65	5.56 a	2.92 b	53	0.0	53 d
65/SeVI	5.05 b	3.38 a	67	0.0	67 a
65/SeIV	4.41 c	2.40 c	54	0.0	55 b
Meal					
0	0.07 c	0.04 c	57	0.006 a	79 bc
0/SeVI	0.27 c	0.20 c	74	0.0 b	93 a
0/SeIV	0.17 c	0.16 c	94	0.0 b	90 c
65	4.40 b	3.72 b	85	0.003 ab	84 ab
65/SeVI	5.34 a	4.63 a	87	0.0 b	90 ab
65/SeIV	5.23 a	4.74 a	91	0.0 b	86 ab

Numbers followed by different letters in the same column differ significantly at the 5% level by Tukey's test; n.s. non significant. $n = 3$.

Capítulo II. Estudios de Bioacumulación y Biotransformación de Selenio en Pescados

Al igual que los vegetales, los pescados y mariscos son otra de las fuentes de Se para los humanos, y por lo tanto se consideran matrices interesantes para llevar a cabo estudios de especiación. Los pescados pueden asimilar Se a través del agua o tras la ingestión de otras especies marinas y fitoplancton. En este capítulo se presentan dos trabajos enfocados a al análisis de Se y sus especies en *Clarias gariepinus*, pescado muy consumido por la población de la ciudad Sagua la Grande, Cuba. El primer trabajo (**“Levels of arsenic, mercury and selenium in *Clarias gariepinus* from Sagua la Grande River, Cuba”**. Int. J. Lim., 49 (2013) 113) se ha desarrollado un estudio ecotoxicológico con el fin de evaluar los niveles de Se derivados de un posible problema de contaminación industrial. Asimismo, también se determinó la concentración de arsénico y mercurio.. Ambos elementos son considerados agentes tóxicos potenciales, y al igual que en el caso de Se, su presencia es muy común en el músculo de pescado. El análisis elemental se llevó a cabo mediante ICP-MS previa mineralización ácida de las muestras. El procedimiento analítico fue validado empleando materiales de referencia certificados: CRM-627 certificado para el As ($4.8 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$), CRM-463 certificado para el MeHg ($2.85 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$), y Murst-ISS A22 certificado para el Se ($7.37 \pm 0.91 \mu\text{g/g}$). Mientras que los niveles de As y Hg se encontraron dentro de los límites de toxicidad, las concentraciones de Se (entre 2.3 and 15.5 $\mu\text{g/g}$) fueron muy superiores a las de otras especies marinas, como sardiana, pez espada y atún. De hecho, en un número importante de individuos se excedieron los niveles de toxicidad establecidos para este elemento. Estos resultados sugirieron la necesidad de desarrollar estudios de especiación, ya que la forma química en la cual se encuentre el Se es determinante para evaluar su toxicidad.

En el segundo trabajo presentado (**“Screening of Se-compounds in fish muscle by LC-ICPMS. SeMet determination in fish muscle by ‘exact matching’ species specific isotopic dilution LC-ICPMS”**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry (*Enviado*)) se ha desarrollado una metodología analítica basada en el uso de (ID) LC-ICP-MS para la identificación y cuantificación de seleno compuestos presentes en el músculo de *Clarias gariepinus*. Como en todo trabajo de especiación, la etapa de extracción de especies fue clave en el procedimiento analítico. Se evaluó el efecto de diferentes tipos de hidrólisis enzimáticas (relación muestra/enzima, medio de extracción, concentración de urea, etc...), empleando varias metodologías analíticas (extracción enzimática asistida por microondas, incubación a temperatura controlada y extracción enzimática asistida por ultrasonidos). En este tipo de matriz, la adición de un agente

desnaturalizante, como es la urea, fue clave para conseguir una extracción cuantitativa. Además, en términos de eficiencia, el empleo de la sonda de ultrasonidos permitió extracciones cercanas al 100% en un tiempo muy reducido (4 minutos).

Los extractos enzimáticos obtenidos fueron analizados mediante (fase inversa (RP) e intercambio aniónico (AE)) LC y SEC-ICP-MS. El Se apareció asociado a dos fracciones de bajo peso molecular, identificándose la especie minoritaria como SeMet. Mientras que las recuperaciones obtenidas tras el fraccionamiento por exclusión molecular fueron entre 98-100%, las suma de especies utilizando RP y AE no superaron el 30% (cuantificado también como SeMet). Se llevó a cabo un análisis más exhaustivo de las fracciones detectadas en SEC, empleando una segunda hidrólisis enzimática, pero solo se pudo identificar (utilizando la metodología disponible) la SeMet y no otras especies por estar asociadas a moléculas de mayor peso molecular resistentes a las hidrólisis enzimáticas. Se empleó el método de dilución isotópica de especies específica “*exact matching*” (SSID)-ICP-MS, utilizando $^{76}\text{SeMet}$, con el fin de verificar las recuperaciones de SeMet obtenidas de los análisis de especiación convencionales. Es interesante comentar que en este trabajo se recoge por primera vez una aplicación de la dilución isotópica de especies específica “*exact matching*” en muestras de pescados.

II.1. Niveles de Arsénico, Mercurio y Selenio en *Clarias gariepinus* procedentes del Río Sagua la Grande, Cuba

“Levels of arsenic, mercury and selenium in *Clarias gariepinus* from Sagua la Grande River, Cuba”

International Journal of Limnology, 49 (2013) 113.

Parte de este trabajo se presentó en:

“XV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Química Analítica”. San Sebastián, España, Julio 2009. Tipo de presentación: Póster

Levels of arsenic, mercury and selenium in *Clarias gariepinus* from Sagua la Grande River, Cuba

Lázaro Lima^{1*}, Maria Isabel López-Heras², Zoyne Pedrero², Susana Olivares Rieumont¹, Yolanda Madrid², Carmen Cámara² and Daniel De la Rosa¹

¹ Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas, Ave. Salvador Allende y Luaces, A.P. 6163, La Habana, Cuba

² Departamento de Química Analítica, Universidad Complutense de Madrid, Ave. Complutense s/n, 28040 Madrid, España

Received 11 September 2012; Accepted 6 April 2013

Abstract – This study first reports concentrations of arsenic (As) and selenium (Se) in fish tissue of *Clarias gariepinus* from Sagua la Grande River in the Villa Clara Province, Cuba. We also confirm the mercury (Hg) levels in these fish obtained previously. Individuals were captured in three areas near Sagua la Grande City, where this fish is a common source of food for the city inhabitants. Concentrations range of As, Hg and Se (in wet weight) were 0.01–0.11 $\mu\text{g.g}^{-1}$; 0.03–0.24 $\mu\text{g.g}^{-1}$ and 0.75–3.87 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectively. As and Se levels were positively correlated ($n = 19$, $\rho = 0.673$, $P < 0.05$). High levels of Se were found in fish tissue and in 31.6% ($n = 6$) of individuals captured exceeded the threshold value for Se toxicity, which means that Se is likely to produce adverse consequences on the fish themselves or on the wildlife organisms that eat them. As and Se concentrations were positively correlated with fish weight and length ($P < 0.05$). Fish from irrigation canal have higher Se concentrations than fish captured in the other two stations. However, no significant differences were found between Hg and As concentrations in fish at the three sampling stations. Finally, as the Se concentrations in *C. gariepinus* were abnormally high, we suggest the need for studies about Se sources in the zone, the effect of Se in fish and the intake associated with fish consumption.

Key words: Arsenic / mercury / selenium / *Clarias gariepinus* / Sagua la Grande River

Introduction

Arsenic (As), mercury (Hg) and selenium (Se) are chemical elements of high environmental and toxicological interest. In aquatic environments these elements have complex biochemical cycles that include the formation of organic species. Furthermore, Se and Hg tend to increase all along the trophic chain (Donohue and Abernathy, 1999; Clarkson and Mago, 2006; Luoma and Presse, 2009).

Arsenic, especially in its inorganic forms, is considered a toxic element, which can cause cancer in humans (Kapaj *et al.*, 2006). Fish are important sources of As in human diet (Baeyens *et al.*, 2009; Sirot *et al.*, 2009). Although in these products, As is mainly present as organic species that are much less toxic, some authors refer that a certain fraction can be found in the toxic inorganic form, so it is always of concern (Moreau *et al.*, 2007; Sirot *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2009).

Hg in the aquatic environment tends to become organic species and bioaccumulate through food chains, so that

fish consumption is the most dangerous source of exposure for humans to the pollutant (Boudou and Ribeyre, 1997; UNEP Chemicals, 2002). Hg species (mainly methylmercury) can cross the cerebral membranes leading to neurological disorders (Environment Canada, 2002). Their effects can be especially severe on foetuses, because this toxic compound can pass from the mother to her offspring (Sanfeliu *et al.*, 2003).

Se is an essential element for human health and it is well known for its antioxidant activity (Dumont *et al.*, 2006). However, above the relatively low normal physiological requirements, it can be toxic (Letavayová *et al.*, 2006). In aquatic systems, Se is accumulated through food chains, resulting in the exposure of animals, such as fish and birds, from higher trophic levels causing them problems in their reproductive systems which adversely affect populations (Lemmy, 1993, 1996; Luoma and Presse, 2009).

Some researchers have reported an antagonistic effect of Se to Hg species in different animals. Moreover, it has long been observed that Se protects animals from the toxicity of both inorganic Hg and MeHg. However,

*Corresponding author: lima@instec.cu

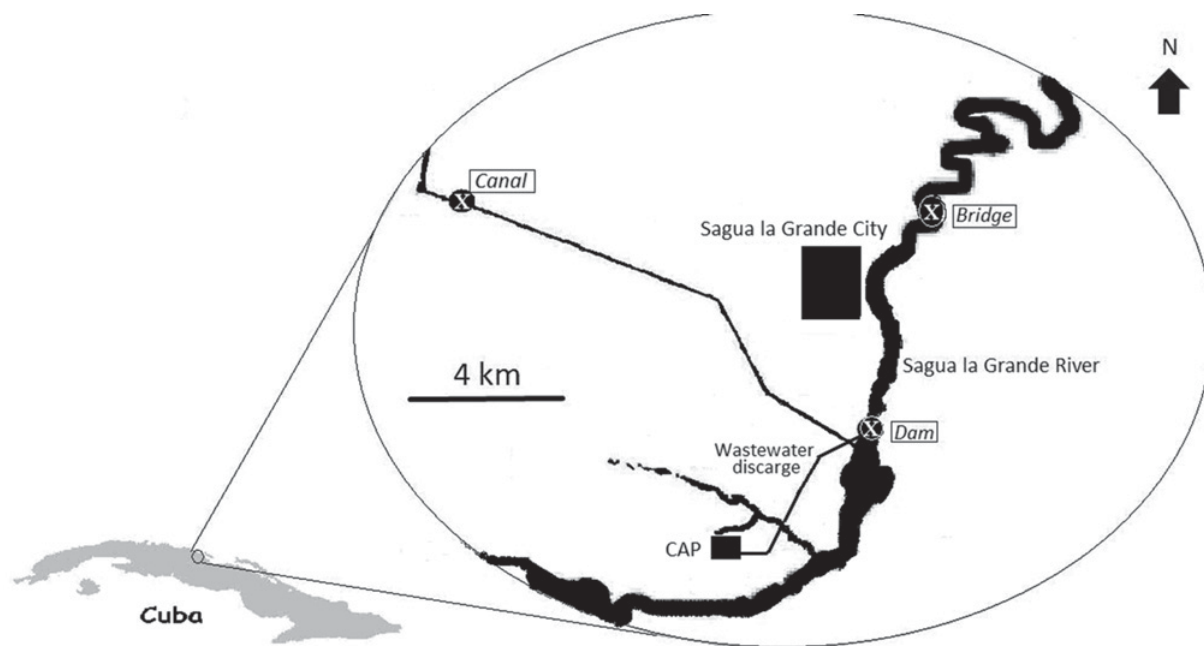


Fig. 1. Sample stations within Sagua la Grande river watershed. Sampling stations are indicated with names inside squares. CAP, Chlor-alkali plant.

additive or even synergistic effects of Hg and Se have also been reported (Khan and Wang, 2009). Mechanisms of interaction of selenium with heavy metals are not yet completely elucidated (Yang *et al.*, 2008).

In the northern province of Villa Clara, Cuba, there are several factors that make interesting to study the above mentioned elements. A mercury-cell chlor-alkali plant (CAP) has caused widespread contamination with Hg in the Sagua la Grande River for several years. Gonzalez (1991) found that the area was polluted with mercury a few years after the beginning of plant operation. Díaz-Asencio *et al.* (2009) also reported a significant enrichment of mercury in the estuary sediment in recent years, reaching a maximum level of $2.68 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ around 1990. Moreover, Olivares-Rieumont *et al.* (2012) found levels of mercury ranging from 0.190 to $0.690 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weigh (dw) in oyster tissues (*Crassostrea rizophorae*) collected at the Sagua la Grande River estuary and offshore mangrove keys 19 km downstream of CAP.

De la Rosa *et al.* (2009a) reported that people living near the Sagua la Grande River are moderate fish consumers, with a weekly intake of freshwater fish of 2.7 times a week. For consumers, *Clarias gariepinus* was second in preference (32%) among favorite fish species. This versatile omnivore specie was introduced in Cuba for fish farming and has rapidly spread in most Cuban rivers, reducing native fish populations and standing at the top of the food webs. (De la Rosa-Medero and Campbell, 2008; De la Rosa *et al.*, 2009b). De la Rosa *et al.* (2009a) found Hg levels in *C. gariepinus* tissue higher than those found in other fish species in the Sagua la Grande River. Although Hg levels do not exceed the $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ wet weight (ww), established by the Cuban authorities as maximum recommended limit (NC-493, 2006), the concentrations found in

fish represent an important risk especially for vulnerable population groups (De la Rosa *et al.*, 2009a, 2009b).

Due to *C. gariepinus* being introduced recently into Cuban watersheds, there is little information about pollutant levels in fish tissue. Therefore, the primary objective of this study is to corroborate the Hg levels obtained by De la Rosa *et al.* (2009b) in *C. gariepinus* tissue from the Sagua la Grande River and determine levels of other potential toxic elements such as As and Se; the latter in its dual role of essential at a normal range and toxic at high concentrations. We were particularly interested in determining the levels of these three elements in fish tissue and their relationships, as well as assess the dependence of element concentrations with fish size and capture sites.

Materials and methods

Sampling

Individuals of *C. gariepinus* were collected from three sampling stations in June 2007: two located on the Sagua la Grande River and the other in an irrigation canal (Fig. 1). Sampling stations are consistent with those used in 2006 by De la Rosa *et al.* (2009b). The “Dam” station was located south of the city and downstream from the CAP effluent discharge point. The “Bridge” station was set up north of the city and downstream from it, whereas the “Canal” station is approximately 10 km west of the city.

Fish selected for this study were in the same length ranges of those evaluated by De la Rosa *et al.* (2009b) (36–74 cm), in order to make comparisons with previous findings. Fish of this size are usually consumed by the

Table 1. Operational parameters of the ICP-MS system.

Plasma conditions	
Forward power	1250 W
Plasma gas flow rate	15 L.min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	0.73 L.min ⁻¹
Nebulizer gas flow rate	0.83 L.min ⁻¹
Nebulizer	Meinhard
Spray chamber	Impact Bead Quartz Spray
Measurement parameters	
Acquisition mode	Continuous
Isotope monitored	²⁰² Hg, ⁷⁵ As and ⁸² Se
Dwell time per point	200 ms
Replicates	3

population of the area. A total of 19 fish were collected and distributed as follows: “Dam” (six fish), “Bridge” (seven fish) and “Canal” (six fish) and were caught using polyethylene nets and the traditional techniques of fish-hooks.

Immediately after capture, fish were measured and weighed, and dorsal fillets were extracted and frozen at – 20 °C. Tissue samples were then thawed, homogenized and lyophilized in the laboratory. Samples were kept at 4 °C prior to laboratory analysis.

Analysis of As, Hg and Se

Fish samples were analyzed at the Analytical Chemistry Department from the Universidad Complutense de Madrid, which has a long experience with metrology in chemistry related-activities through both its participation and/or co-ordination in numerous projects of reference material certification (BCR).

Fish tissue samples (about 500 mg) were accurately weighed, and placed in a Teflon digestion vessel, after adding 2.5 mL of HNO₃ (65%) and 1 mL H₂O₂ (30%) and digested in a microwave oven at 43% power output. The pressure was kept at 20 psi during 15 min, increased to 40 psi for 30 min and kept 1 h at 85 psi. The final volume was adjusted to 25 mL with ultrapure water for analysis. A quadrupole Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), Thermo X-Series (Thermo Electron, Windsford, Cheshire, UK) equipped with a Meinhard nebulizer, a Fussel Torch, and an Impact Bead Quartz Spray Chamber cooled by a Peltier system was used for determination of As, Hg and Se. The mass calibration of the ICP-MS instrument was tuned daily with a solution containing 1 µg.L⁻¹ of Li, Be, Co, Ni, In, Ba, Ce, Pb, Bi and U in 5% (v/v) HNO₃. The operation conditions and data acquisition parameters are summarized in Table 1.

The validation of analytical methodology was performed, detection and quantification limits were: 0.11 and 3.52 ng.g⁻¹ ww for As, 0.10 and 0.37 ng.g⁻¹ ww for Hg and 4.07 and 13.7 ng.g⁻¹ ww for Se, respectively. For analytical accuracy assessment, the procedure was separately applied to three certified reference materials

(CRMs): Tuna fish tissue CRM-627 certified for As (4.8 ± 0.3 µg.g⁻¹), Tuna fish tissue CRM-463 certified for Hg (2.85 ± 0.16 µg.g⁻¹), and Antarctic Krill Murst-ISS A22, certified for Se (7.37 ± 0.91 µg.g⁻¹). The measured concentrations were: 4.3 ± 0.4 µg.g⁻¹ for As in CRM-627, 2.80 ± 0.02 µg.g⁻¹ for Hg in CRM-463 and 7.42 ± 0.52 µg.g⁻¹ for Se in Antarctic Krill Murst-ISS A22, no significant differences were detected between the CRMs certified values and the experimental ones.

Statistical analysis

Data were evaluated to check normality using the Shapiro–Wilk test. As data showed significant evidence for non-normal distribution, non-parametric tests for statistical analysis were used. The Spearman’s rank correlation (ρ) was used to assess possible relationships between body fish size and concentrations of trace elements levels, and also inter-elements effects. The Kruskal–Wallis H -test was used to compare the body fish size (length and weight) and elements concentrations between sampling stations, followed by a Mann–Whitney W -test as *post-hoc* test. A multiple regression model was used to assess element concentrations contributing significantly to the variance in fish length. The level for significance was chosen as p value less than 0.05.

Results and discussion

Total concentrations of As, Hg and Se in *C. gariepinus*

As, Hg and Se concentrations for each fish fillet samples are presented in Figure 2. Arsenic concentrations varied between 0.01 and 0.11 µg.g⁻¹ ww (median 0.03 µg.g⁻¹ ww, for $n=19$). These concentrations are lower in all cases than the recommended maximum concentration limit by the Cuban standard of 1 µg.g⁻¹ ww of As for fish consumption (NC-493, 2006) and in the same order of magnitude reported by other authors in freshwater fish. Hinck *et al.* (2009) reported average concentration of 0.11 µg.g⁻¹ ww for As in fish collected at 111 sites from some important river basins from the USA, with a maximum of 1.95 µg.g⁻¹ ww for whole body. During a survey on fish fillets from Oak Ridge Reservation in Tennessee, USA, Burger and Campbell (2004) detected the presence of As in a concentration range between 0.085 and 0.140 µg.g⁻¹.

Hg concentrations ranged between 0.03 and 0.24 µg.g⁻¹ ww (median 0.16 µg.g⁻¹ ww, $n=19$) (Table 2), similar values were found by De la Rosa *et al.* (2009b) in fillets of *C. gariepinus* captured in this river in 2006 (0.07 to 0.38 µg.g⁻¹ ww, median 0.18 µg.g⁻¹ ww, $n=27$). None of the samples exceeded the maximum limits recommended by the Cuban authorities for fish consumption of 0.5 µg.g⁻¹ ww of Hg (NC-493, 2006). Only two samples (10%) had levels higher than 0.2 µg.g⁻¹ ww, limit recommended by the World Health Organization for

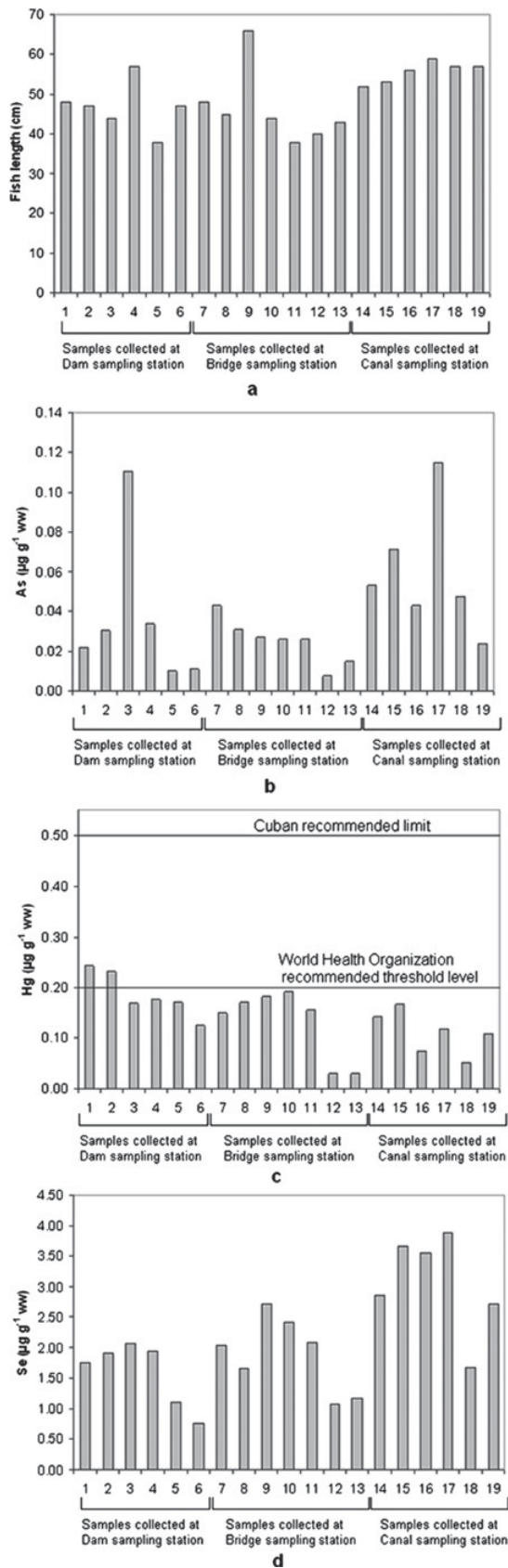


Fig. 2. Fish length (a) and As (b), Hg (b) and Se (c) concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ww) in fish fillet of *C. gariepinus*.

fish consumed by vulnerable people (World Health Organization, 1990).

Se concentrations in fillets of *C. gariepinus* were between 0.75 and $3.87 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ww (median $2.03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ww, $n = 19$) or between 2.3 and $15.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight (dw). These levels are higher than the average values reported for other freshwater fish. For instance, in the Savannah River, USA, were found average levels of Se in fillet between 0.21 and $0.64 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ww for various species (Burger *et al.*, 2001). Hinck *et al.* (2009) studied piscivorous and benthivorous fish at 111 sites from US river basins and reported a mean of $0.59 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ww of Se in whole fish with a maximum value of $4.66 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ww. Lemly (1993) proposed an Se reference concentration of $4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dw in whole body as threshold values for selenium toxicity involving reproductive failures and teratogenic deformities in young fish, although adults can survive and appear healthy. For muscle, this value is $8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dw (Lemly, 1993) or $2.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ww according to Burger and Campbell (2004) when a moisture value of 67% is used for the conversion. This threshold value for selenium toxicity is exceeded in 31.6% ($n = 6$) of *C. gariepinus* individuals captured in the Sagua la Grande River, which means that Se is likely to produce adverse consequences on the fish themselves or on the wildlife organisms that eat them. Five of the samples that exceed the threshold value were collected in the “Canal” sampling station.

There are no previous reported background levels of Se in fish fillets in Cuba. Moreover, levels of Se are not regulated for fishing products in the Cuban Food Sanitary Standard (NC-493, 2006). However, on the basis of existing information about industrial sources in the area, there is no evidence of any anthropogenic sources that could increase Se concentrations in the region. For that reason, we hypothesized that high Se levels in fish may be related to existing levels of this element in the aquatic environment, although there are no reports of Se concentrations in soils and sediments in the area either. More information is needed about Se levels in the aquatic environment of the Sagua la Grande River to reach a definitive conclusion about transfer mechanisms toward the fish; however, our results suggest bioaccumulation of selenium by *C. gariepinus*. High concentration of Se found in these fish is an interesting finding. Although the number of samples taken in this study is not large, so it may be considered as preliminary, it provides the basis for further studies in order to verify the presence of this element in the area.

Correlations between element concentrations and fish size

As shown in Table 3, the only statistically significant correlation inter-elements was found between As and Se concentrations ($\rho = 0.673$, $P < 0.05$). Although it has been reported that As and Se are metalloids with similar chemical properties, biological interactions between these two elements depend on their chemical forms (Zeng *et al.*,

Table 2. Summary data and As, Hg and Se levels in *C. gariepinus* in the three sampling stations.

		Sampling station		
		“Dam”	“Bridge”	“Canal”
Number of individuals		6	7	6
Total weight (g)	Median	1000	540	1668
	Range	425–1900	390–2420	1380–1840
Total length (cm)	Median	47	44	57
	Range	38–57	38–66	52–59
As ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ww)	Median	0.03	0.03	0.05
	Range	0.01–0.11	0.01–0.04	0.02–0.11
Hg ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ww)	Median	0.17	0.16	0.11
	Range	0.13–0.24	0.03–0.19	0.05–0.17
Se ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ww)	Median	1.84	2.04	3.20
	Range	0.75–2.07	1.08–2.72	1.67–3.87

Table 3. Spearman’s rank correlations between element concentrations and fish size. Given are correlation coefficients.

	As	Hg	Se	Total length	Total weight
As	–	NS	0.673*	0.527*	0.480*
Hg		–	NS	NS	NS
Se			–	0.566*	0.497*
Total length				–	0.969*
Total weight					–

*Statistical significance $P < 0.05$.

NS, not significant.

2005). Significant correlations between As and Se in individuals from other fish species as *Morone chrysops* were also reported (Burger and Campbell, 2004).

Se and Hg concentrations were not statistically correlated ($P > 0.05$; Table 3). Although some authors have found significant correlations between these two elements in the fillets of different species the statistical relationship may not exist. For example, Lima *et al.* (2005) in Piriá River and in Grande Lake assessed levels of Hg and Se in ten different fish species, but they only found statistically significant relationships between Hg and Se for *H. malavaricus* and *Leporinus* sp. species. Others like Burger *et al.* (2001) found in Savannah River only significant correlations for three fish species of the eleven examined. Although several authors have reported an antagonistic effect of Se on Hg metabolism, mechanisms of this antagonism are unclear (Yang *et al.*, 2008). Yang *et al.* (2010) found that when Se concentrations in fish fillets were below certain values, usually Hg levels were high. This possibly suggests that threshold concentrations of Se in fish must be reached before a clear protective role of Se against Hg assimilation become noticeable. A similar trend is observed between these two elements in *C. gariepinus*; however, more data are needed to reach conclusive results.

Significant and positive correlations were observed between As and Se concentrations in fillets and body fish length and weight (Spearman correlations with $P < 0.05$) (Table 3). It is reported that the primary sources of Se in fish is related to diet (Luoma and Presse, 2009). Fish can accumulate Se found in their environment and this process can be relatively fast (Lemly, 1999). *C. gariepinus* are voracious omnivorous, which increases their weight in a

short time, making them ideal for growing in farms. Schram *et al.* (2008) conducted experiments with this fish to achieve enrichment of Se in fish tissue providing a diet rich in Se, showing that it is possible to increase the levels of Se in fish fillet in a relatively short time. In Cuban water bodies, this fish quickly occupies the top of the food chain and feeds from various sources such as detritus, filamentous algae, zooplankton, macrophytes, aquatic and terrestrial insects, nematodes, mollusks, crustaceans, birds, and fish (De la Rosa-Medero and Campbell, 2008). Similar behavior was reported by Desta *et al.* (2007) for these fish from Lake Awassa, Ethiopia. *C. gariepinus* capture their prey by gulping them with a rapid opening of the mouth and then retaining them either on the gillrakers or fine recurved teeth arranged on dentary, premaxillary, vomerine and pharyngeal bands. This fish exhibits a variety of feeding strategies including sucking the surface for terrestrial insects and plant fragments washed into the water by heavy rains and pack-hunting of small cichlids. They can suck the prey along with water and suspended particles. Ingestion of particles (biotic and abiotic) is an input way of selenium into living organisms (Luoma and Presse, 2009). Moreau *et al.* (2007) have found that Se tends to be magnified through the consumption of algae and invertebrates, so the levels of selenium in *C. gariepinus* apparently reflects levels found in all these sources in the aquatic system of the Sagua la Grande River.

No significant correlation ($P > 0.05$) was found between Hg and fish size (either length or weight) (Table 3). A similar result was obtained by De la Rosa *et al.* (2009b) who suggested that this behavior could be explained by the dietary habits of *C. gariepinus* in Sagua la Grande River. Owing to its omnivorous nature, it can feed on fish but

also on small terrestrial insects, mollusks and fruits (Toledo-Perez *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 1988) depending on the availability of food. This ability to change food source might affect this correlation, as the body mass increases not only due to fish consumption, which is the most recognized source of accumulation of Hg in the aquatic food chain.

Relationships between locations and element concentrations in *C. gariepinus*

As and Hg concentrations were similar in the fillets of the fish from the three sampling stations ($H = 5.239$, $P > 0.05$ and $H = 5.820$, $P > 0.05$, respectively). Although no significant differences between the medians were found for mercury among the three stations, at “Dam” there is a tendency for higher values. Similar results were found in an earlier work (De la Rosa *et al.* 2009b). However, it appears that the high mobility of these fish, likely reflects homogeneity in exposure to Hg throughout the region.

It were observed significant differences among Se concentrations in the different sites ($H = 7.423$, $P < 0.05$). Se concentrations in fish captured in the sampling station “Canal” were significantly higher than levels found in fish from the other two stations (“Canal” and “Dam”: $W = 32.0$, $P < 0.05$; “Canal” and “Bridge”: $W = 37.0$, $P < 0.05$). On the other hand, there were significant size differences among the fish as a function of location ($H = 6.102$, $P < 0.05$ and $H = 6.075$, $P < 0.05$ for weight and length, respectively), with fish collected from “Canal” being the largest.

“Canal” station is located approximately 10 km away from Sagua la Grande City, at a site with difficult access, while the other two stations are closer to the city, so water pollution and overfishing could affect fish size in these latter stations. This behavior (regarding fish size) was also observed in fish collected in a previous year (De la Rosa *et al.*, 2009b).

A total of 39.0% of the variability in log length of the fish ($P < 0.10$) was explained by a multiple regression model, which included As, Hg and Se concentrations as independent variables. Only Se concentration entered significantly in the model (coefficient value $\beta = 0.05$, $P < 0.05$). This result suggests that differences between Se concentrations in the sites may be related to differences in the size of fish rather than to location. As it was mentioned above, there is no evidence of any Se pollution sources in the studied area.

Conclusions

Results confirm previous studies relate to Hg concentration in *C. gariepinus* from the Sagua la Grande River, Cuba, and provide new information about low As levels in the fish. High levels of Se were found in *C. gariepinus* fillets. In 31.6% of individuals Se concentrations exceeded threshold values for Se toxicity, which means that Se is

likely to produce adverse consequences on the fish themselves or on the wildlife organisms that eat them. Significant differences were found for Se in fish captured in the sampling stations, probably influenced by differences in fish size at these stations. Owing to the high levels of Se found in fish, it is necessary to assess the likely sources of Se in the region and to study the effect of Se in fish and the intake associated with fish consumption.

Acknowledgements. Y. Madrid kindly acknowledges the Spanish Government and the Regional Government of Madrid for financial support through the project CTQ-2001-22732 and CAM-S2009/AGR/1464, respectively. I. López acknowledges the Ministry of Education of the Community of Madrid and the European Social Fund for funding through the program Research Contract for Staff Support (Project no. S-0505/AGR/0312). The authors acknowledge Cuban Environmental Agency for financial support through project PRCT No. 30923, as well as the fishermen from Sagua la Grande City for their enthusiastic collaboration.

References

- Baeyens W., Gao Y., De Galan S., Bilau M., Van Larebeke N. and Leermakers M., 2009. Dietary exposure to total and toxic arsenic in Belgium: importance of arsenic speciation in North Sea fish. *Mol. Nutr. Food Res.*, 53, 558–565.
- Boudou A. and Ribeyre F., 1997. Mercury in the food web: accumulation and transfer mechanisms. In: Sigel, A. and Sigel, H. (eds), *Metal Ions in Biological Systems, Mercury and its Effects on Environment and Biology*, Marcel Dekker, New York.
- Burger J. and Campbell K.R., 2004. Species differences in contaminants in fish on and adjacent to the Oak Ridge Reservation, Tennessee. *Environ. Res.*, 96, 145–155.
- Burger J., Gaines K., Boring S., Stephens W., Snodgrass J. and Gochfeld M., 2001. Mercury and selenium in fish from the Savannah River: species, trophic level, and locational differences. *Environ. Res.*, A, 87, 108–118.
- Clarkson T. and Mago L., 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critic. Rev. Toxicol.*, 36, 609–662.
- De La Rosa D., Olivares S., Lima L., Diaz O., Moyano S., Bastias J. and Muñoz O., 2009a. Estimate of mercury and methyl mercury intake associated with fish consumption from Sagua la Grande River, Cuba. *Food Addit. Contam.*, B, 1–7.
- De La Rosa D., Lima L., Olivares S., Graham D., Enriquez I., Diaz O., Bastias J. and Muñoz O., 2009b. Assessment of total mercury levels in *Clarias gariepinus* from the Sagua la Grande River, Cuba. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 82, 101–105.
- De la Rosa-Medero D. and Campbell L., 2008. Implications of *Clarias gariepinus* (african catfish) propagation in cuban waters. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 4, 521–522.
- Desta Z., Borgström R., Rosseland B. and Dadebo E., 2007. Lower than expected mercury concentration in piscivorous African sharp-tooth catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). *Sci. Total Environ.*, 376, 134–142.
- Díaz-Asencio M., Alonso-Hernández C., Bolanos Y., Gómez-Batista M., Morabito R., Hernández-Albernas J.

- and Sanchez-Cabeza J., 2009. One century sedimentary record of mercury and lead pollution in the Sagua estuary (Cuba) derived from ^{210}Pb and ^{137}Cs chronology. *Mar. Pollut. Bull.*, 59, 108–115.
- Donohue J. and Abernathy C., 1999. Exposure to inorganic arsenic from Fish and Shellfish. In: Chappell W., Abernathy C. and Calderon R. (eds), *Arsenic Exposure and Health Effects*, Elsevier Science, BV.
- Dumont E., Vanhaecke F. and Cornelis R., 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385, 1304–1323.
- Environment Canada, 2002. Canadian Tissue Residue Guidelines for the Protection of Wildlife Consumers of Aquatic Biota: Methylmercury, National Guidelines and Standard Office, Ottawa, Canada.
- Gonzalez H., 1991. Mercury pollution caused by a chlor-alkali plant. *Water Air Soil Pollut.*, 56, 83–93.
- Hinck J., Schmitt C., Chojnacki K. and Tillitt D., 2009. Environmental contaminants in freshwater fish and their risk to piscivorous wildlife based on a national monitoring program. *Environ. Monit. Assess.*, 152, 469–494.
- Kapaj S., Peterson S., Liber K. and Bhattacharya P., 2006. Human health effects from chronic arsenic poisoning—a review. *J. Environ. Sci. Health A, Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.*, 41, 2399–2428.
- Khan M. and Wang F., 2009. Mercury–selenium compounds and their toxicological significance: toward a molecular understanding of the mercury–selenium antagonism. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28, 1567–1577.
- Lemly A.D., 1993. Guidelines for evaluating selenium data from aquatic monitoring and assessment studies. *Environ. Monit. Assess.*, 28, 83–100.
- Lemly A.D., 1996. Assessing the toxic threat of selenium to fish and aquatic birds. *Environ. Monitor. Assess.*, 43, 19–35.
- Lemly A.D., 1999. Selenium impacts on fish: an insidious time bomb. *Hum. Ecol. Risk Assessment*, 5, 1139–1151.
- Letavayová L., Vlckova V. and Brozmanova J., 2006. Selenium: from cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*, 227, 1–14.
- Lima A.P.S., Sarkis J.E.S., Shihomatsu H.M. and Müller R.C.S., 2005. Mercury and selenium concentrations in fish samples from Cachoeira do Piriá Municipality, Pará State, Brazil. *Environ. Res.*, 97, 236–244.
- Luoma S. and Presse T., 2009. Emerging opportunities in management of selenium contamination. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 8483.
- Moreau M., Surico-Bennett J., Vicario-Fisher M., Gerads R., Gersberg R. and Hurlbert S., 2007. Selenium, arsenic, DDT and other contaminants in four fish species in the Salton Sea, California, their temporal trends, and their potential impact on human consumers and wildlife. *Lake Reservoir Manag.*, 23, 536–569.
- NC-493, 2006. Contaminantes metálicos en alimentos – Regulaciones sanitarias. Oficina Nacional de Normalización, Ciudad de La Habana, Cuba (In Spanish).
- Olivares-Rieumont S., Lima L., Rivero S., Graham D. and Alonso-Hernandez C., 2012. Mercury levels in sediments and mangrove oysters, *Crassostrea rizophorae*, from the North Coast of Villa Clara, Cuba. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 88, 589–93.
- Sanfeliu C., Sebastia L., Cristofol R. and Rodriguez-Farré E., 2003. Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox. Res.*, 5, 283–306.
- Schram E., Pedrero Z., Cámara C., Der Heul J. and Luten J., 2008. Enrichment of African catfish with functional selenium originating from garlic. *Aquaculture Res.*, 39, 850–860.
- Sirof V., Guérin T., Volatier J. and Leblanc, J., 2009. Dietary exposure and biomarkers of arsenic in consumers of fish and shellfish from France. *Sci. Total Environ.*, 407, 1875–1885.
- Toledo-Pérez J., Llanes-Iglesias J., Millares-Dorado N. and Lazo-de la Vega Valdez J., 2007. Evaluación de dietas alternativas en la alimentación de *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695–7504 Volumen VIII Número 6. (In Spanish).
- UNEP Chemicals, 2002. Global Mercury Assessment, UNEP Chemicals, Geneva.
- Williams G., West J., Koch I., Reimer K. and Snow E., 2009. Arsenic speciation in the freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark. *Sci. Total Environ.*, 407, 2650–2658.
- World Health Organization, 1990. Environmental Health Criteria 101: Methylmercury. Programme of Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Yang D.Y., Chen Y.W., Gunn J.M. and Belzile N., 2008. Selenium and mercury in organisms: interactions and mechanisms. *Environ. Rev.*, 16, 71–92.
- Yang D.Y., Ye X., Chen Y.W. and Belzile N., 2010. Inverse relationships between selenium and mercury in tissues of young walleye (*Stizosedion vitreum*) from Canadian boreal lakes. *Sci. Total Environ.*, 408, 1676–1683.
- Zeng H., Uthus E. and Combs G., 2005. Mechanistic aspects of the interaction between selenium and arsenic. *J. Inorg. Biochem.*, 99, 1269–1274.
- Zheng W., Pan J. and Liu W., 1988. Culture of catfish in China. *Aquaculture*, 75, 35–44.

II.2. Identificación de Compuestos de Selenio en Músculo de Pescado mediante LC-ICPMS. Determinación de SeMet en Músculo de Pescado mediante Dilución Isotópica de Especies Específica “*exact matching*” LC-ICPMS.

“Screening of Se-compounds in fish muscle by LC-ICPMS. SeMet determination in fish muscle by ‘exact matching’ species specific isotopic dilution LC-ICPMS”

Journal of Analytical Atomic Spectrometry (*Enviado*)

Parte de este trabajo se presentó en:

“European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry”. Zaragoza, España, Febrero 2011.

Tipo de presentación: Póster

Screening of Se-compounds in fish muscle by LC-ICPMS. SeMet determination in fish muscle by 'exact matching' species specific isotopic dilution LC-ICPMS

Isabel Lopez-Heras, Lazaro Lima, Susana Rieumont Heidi Goenaga-Infante, Carmen Cámara and Yolanda Madrid

Abstract

Several sample treatments for Se-species extraction based on enzymatic hydrolysis and different methodologies (microwave assisted extraction, ultrasonic probe assisted extraction and incubation at controlled temperature) were compared for identification and quantification of selenocompounds in *Clarias gariepinus* muscle using LC-ICPMS- based techniques. Selenium species were quantitatively extracted by using enzymatic probe sonication with protease previous addition of 7 M urea in 4 minutes. Screening of selenocompounds in the proteolytic extracts was performed by size exclusion chromatography- ICPMS. Selenium appeared associated to two fraction of low molecular weight (5KDa and 0.1 KDa) with the second peak matching at the retention time of SeMet. The recovery of SEC step was around 100-98%. However, low Se recoveries (30%) were obtained when analyzing the proteolytic extracts by RP-LC-ICPMS and AE-LC-ICPMS, being only SeMet quantitatively chromatographic recovered. In order to improve chromatographic recovery, fractions of SEC peaks were collected and submitted to a second enzymatic hydrolysis by using protease and alcalase and then introduced to a PRP X-100 column coupled to ICPMS. No significant improvement in recovery was obtained after a second enzymatic hydrolysis of 5KDa Se-compounds therefore being these compounds responsible of the low chromatographic HPLC recoveries when selenium speciation is performed in fish muscle samples. SeMet was quantified in the fish muscle by using 'exact matching' species specific isotopic dilution (ID) LC- ICPMS. Concentrations of $1.8 \pm 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ and $2.18 \pm 0.04 \text{ mg kg}^{-1}$ (expanded uncertainty, $k = 2$) for SeMet in two fish samples of Fish1 and Fish2, respectively, were obtained by (ID) LC-ICPMS. To the best of our knowledge, this is first application of species specific isotope dilution for the accurate and precise determination of SeMet in fish tissues.

1. Introduction

Selenium (Se) is an essential element for human health. Its deficiency decreases selenoprotein expression and leads to mutations in synthesis cofactors altering biological processes, and therefore promoting the appearance of several diseases. The concentration range in which selenium is considered toxic or essential is very narrow. It has been estimated that the ingestion of foodstuffs with a Se content above $1 \mu\text{g Se g}^{-1}$ can induce toxicity, meanwhile a concentration below $0.1 \mu\text{g Se g}^{-1}$ leads to deficient status [1,2]. In human beings, the main source of selenium is through diet. The necessity of supplement possible deficiencies of Se through the diet has increased the interest into development of functional food products enriched with this element. Following this approach, some authors have performed the development of seafood-based nutritional supplements materials [3]. It has been demonstrated that fish can take up Se directly from the water and/or by eating other marine species and phytoplankton through the food chain [4]. Because of this, fish and shellfish are considered Se rich foodstuffs, although the levels of Se can vary depending on fish species. Cabañero *et al.* determined the Se total content in different fish of high consumption such as tuna, swordfish and sardine. The reported values were found in the range of $1.13 \pm 0.04 \mu\text{g Se g}^{-1}$ to $1.58 \pm 0.02 \mu\text{g Se g}^{-1}$ [5]. Similar Se concentration was found in Niboshi, a common foodstuff processed from Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) [6]. A higher content of Se was quantified in *Misgurnus anguillicaudatus* muscle tissue ($6.280 \mu\text{g Se g}^{-1}$) [7]. Burger *et al.* found levels of selenium in fish muscle tissues in the range of $0.21\text{--}0.64 \mu\text{g g}^{-1}$ [8]. In fish and seafood materials, the bioavailability of Se still appears to remain controversial depending on chemical form of Se compounds [9]. Although the levels of Se in some fish and shellfish are elevated, in some cases this Se is little available due to the interaction with other metals present in matrix [10, 11]. In addition, Ornsrud *et al.* demonstrated that SeMet species was more bioavailability than selenite in Se-enriched salmon, showing also an increase in GPx activity. Recently, the presence of selenium in sea-food materials has been reviewed by Sakura *et al* [12]

Although the Selenium content in seafood is higher than in terrestrial foodstuffs, little is known about the chemical forms of selenium species in seafood. Proteinous selenium species like SeMet and SeCyst derivatives has been found in different type of seafood [12, 13, 14, 7, 15]. However, a large portion of selenium might be associated to organo

selenium compounds other than seleno amino acids and their derivatives. Recently, Yamashita *et al* [16] have discovered a novel Se compound present in several tuna tissues and blood of blue tuna fish. This compound has been called selenoneine. For selenium speciation, efficient extraction of Se species from sample matrix without degrading the species is required. Methods based on enzymatic hydrolysis using proteinases such as, protease, subtilisin, trypsin, chymotrypsin, proteinase and proteinase N have been widely used to efficiently extract Se species in fish and other biological matrix. Enzymatic hydrolysis has been performed by applying different methodologies such as: incubation at controlled temperature, microwave-assisted enzymatic extraction (MAEE) and sonication assisted enzymatic hydrolysis [12, 17, 18, 19, 20, 21, 22]. Liquid chromatography (LC) in combination with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) for detection is currently the most commonly used technique for selenium speciation and quantification. Although enzymatic hydrolysis followed by LC-ICPMS is widely implemented for selenium speciation in seafood samples, it is important to note that chromatography recoveries is often not complete when analysing extracts of fish samples. Recoveries of about 28% for tuna, 35% for shellfish, 38% for BCR627, 56% in shark after enzymatic hydrolysis have been reported [17]. It has been demonstrated that during the enzymatic extraction of marine tissues, some Se compounds might remain bound in peptide form, depending on the cleavage specificity of the enzyme and the analyzed fish species. In most studies, however chromatography recoveries are not reported. The use of ICPMS enables also quantification for isotopic dilution. This technique not only allows a precise quantification of species but it is able to correct the possible transformation or degradation of species during sample treatment [23]. However, application of species-specific isotope dilution has been limited due to the lack of commercially available specific –species spike. In this work, the development of an analytical method based on the use of (ID) HPLC-ICP-MS previous enzymatic extraction for quantification of selenocompounds in *Clarias gariepinus* muscle has been performed. This species is a versatile omnivore and predator in Cuban rivers, and it is a common food source of many residents [24]. The high selenium levels found in their muscle (6.2-15.5 $\mu\text{g Se g}^{-1}$) turn this sample in an interesting matrix to carry out selenium speciation studies.

2. Experimental Section

2.1. Instrumentation

A 1000 W MSP (microwave sample preparation system) microwave oven (CEM, Matthews, NC, USA) equipped with temperature and pressure feedback controls and 12 high pressure vessels of 100 mL inner volume, operating at a maximum power of 1600 W, was employed for the digestion and enzymatic extraction processes.

A Sonoplus ultrasonic homogenizer (Bandenlin, Berlin, Germany) equipped with a titanium 3 mm diameter microtip and fitted with a high-frequency generator of 2,200 W at frequency of 20 KHz, and an ultrasonic bath (JP Selecta, Barcelona, Spain) were used to extract the selenocompounds present in lyophilized samples.

An Eppendorf Centrifuge 5804 R F34-6-38 (Eppendorf, Hamburg, Germany) with 10 kDa cut-off filters (Millipore, USA) was used for the separation of the supernatant after extraction of Se species.

HPLC-ICP-MS measurements were carried out using a PU-2089 LC pump (JASCO, Tokio, Japan) fitted with a six-port injection valve (model 7725i, Rheodyne, Rohner Park, CA, USA) with a 100 μ L injection loop for chromatographic separation and an Agilent 7700x collision/reaction cell ICP-MS (using H₂ collision gas) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) for elemental specific detection. Chromatographic separations were performed using different columns; an anion exchange analytical column PRP-X100 (250 \times 4.1 mm, 10 μ m) (Hamilton, GR, Switzerland), a size exclusion chromatographic column BioBasic-Sep 60 (from 0.1 kDa to 6 kDa) (Thermo Fisher, Madrid, Spain), and a reversed-phase analytical column Zorbax Rx C₈ (250 x 4.1 mm, 10 μ m) (Agilent, SC, USA). The outlet of the column was directly connected to the conical nebulizer of the ICP-MS with PEEK tubing. The operating parameters are summarized in Table 1.

The 0.45 μ m nylon filters (Millipore, USA) were used to filter all the LC mobile phases and 0.22 μ m Millex-HV filters (Millipore, USA) were used to filter the samples before injection into the chromatographic columns.

2.2. Reagents and standards

All reagents used were of analytical grade. Cyclohexane, hydrogen peroxide (35%) and nitric acid (65%) were purchased from Merck (Merck, Darmstadt, Germany)

For enzymatic hydrolysis: non-specific pronase E and lipase VII enzymes, and urea from Sigma (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were employed. In addition, two buffer solutions at pH 7.5: a 50 mM phosphate solution and a 100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl (Tris-HCl) solution from Sigma (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), were used as extracting media.

For liquid chromatography (LC)-inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) studies three mobile phases were employed. For anionic exchange chromatographic separation, the mobile phase used was 10 mM citric acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in 2% methanol (Scharlau, Barcelona, Spain), at pH 5 with ammonium hydroxide (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). For size exclusion chromatographic separation, 50 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and 0.05 mM potassium chloride (Merck, Darmstadt, Germany) at pH 6.8 was employed as mobile phase. Finally, the mobile phase used in reverse phase chromatographic separation containing 0.1% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and 2% methanol (Scharlau, Barcelona, Spain) at pH 2.1.

Standard stock solutions of 1000 mg L⁻¹ of selenomethionine (SeMet), selenomethylselenocysteine (SeMetSeCys) and selenocystine (SeCys₂) (Sigma) were prepared in ultra-pure water (18.2 MΩ cm⁻¹) from a Milli-Q water purification system (Millipore, MA, USA), and 3% hydrochloric acid (Merck). Inorganic selenium solutions were prepared by dissolving sodium selenite (Na₂SeO₃) and selenate (Na₂SeO₄) (Merck) in Milli-Q water. Stock solutions were stored at 4°C, whereas working standard solutions were prepared daily by dilution.

An isotopically enriched ⁷⁶Se standard of Se-DL-methionine was purchased from Isosciences (King of Prussia, USA). The isotopic enrichment of the inorganic ⁷⁶Se standard used to synthesise the ⁷⁶Se-enriched SeMet was 99.8%, as indicated by the

manufacturer. A stock solution of 1 mg mL^{-1} was prepared by dissolving the Se standard substance in degassed ultra-pure water. This stock solution was kept in the dark at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$

2.3. Samples and Sample Preparation

Individuals of *Clarias gariepinus* were collected from Sagua la Grande River (Sagua la Grande, Cuba). The fishes were caught using polyethylene nets and the traditional techniques of fishhooks. Immediately after their capture, the dorsal fillets were extracted and frozen at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Tissue samples were then thawed, homogenized, and lyophilized.

2.4. Procedures

2.4.1. Total selenium determination

The samples were defatted following the procedure described by Bierla et al. [25]. A 2.5 g of sample were shaken with 12 mL of cyclohexane for 20 min and centrifuged at 10000 rpm for 15 min. The supernatant was removed and the procedure was repeated twice by shaking the solid residue with a fresh portion of cyclohexane. Finally, the defatted samples were dried in an oven at $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and lyophilized. Lyophilized fish samples (about 200 mg) were accurately weighted and placed in a 100 mL teflon digestion vessel with 2.5 mL of HNO_3 (65%) and 1 mL H_2O_2 (35%). Samples were digested at $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min at 1600 W in a microwave oven. The resulting solutions were diluted with Milli-Q water up to 25 mL. The total Se concentration was determined by external calibration method using a standard solution of Se (IV). The performance of the method was tested by analyzing the Antaerctic Krill Murst-ISS A22 certified reference material certified for selenium ($7.37 \pm 0.91 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$), from Institute for Reference Materials and Measurements.

2.4.2. Enzymatic hydrolysis of Se-compounds in fish samples

The enzymatic extraction of selenium species was performed following the steps shown in Fig. 3. A denaturalization of protein structure was carried out prior to enzymatic hydrolysis; about 100 mg of sample were weighted into 5 mL polypropylene

tube with 1.5 mL of 7 M urea solution in 0.1 M Tris-HCl buffer at pH 7.5. The mixture was sonicated for 2 min at 40% ultrasound amplitude. The resulting suspension was transferred into a vial and diluted by adding 8.5 mL of 0.1 M Tris-HCl buffer solution. Then a 40 mg of pronase E, corresponding to 2.5:1 sample/enzyme mass ratio, were added in order to carry out the proteolytic hydrolysis by ultrasonic probe sonication for 2 min. The enzymatic extract was passed through 10 kDa molecular weight cutoff filters by centrifugation at 9600 rpm for 15 min. The filtrates were collected, divided into aliquots and stored at 4 °C until analysis by ICP-MS and LC-ICP-MS. The concentration of extracted Se was determined by external calibration method.

2.4.3. Screening of Se-compounds in fish samples by LC-ICPMS

The following chromatographic separation mechanisms coupled to ICPMS were used for screening Se-compounds in the enzymatic extracts: 1) Size-exclusion chromatography by using a BioBasic-Sep 60 column and a mobile phase of 50 mM Tris-HCl and 0.05 mM KCl (pH 6.8) at 0.7 mL min⁻¹ for 12 min, 2) Anion-exchange chromatography by using a PRP-X100 column and a mobile phase of 10 mM citric acid in 2% methanol (pH 5.0) at 1 mL min⁻¹ for 10 min, and 3) Reverse-phase chromatography by using a Zorbax Rx C₈ column and a mobile phase of 0.1% trifluoroacetic acid and 2% methanol at pH 2.1.

2.4.4. Sample Preparation and Procedure for the Determination of SeMet in Fish by Isotope Dilution HPLC-ICP-MS

The extraction procedure used for the ID approach was the same as described above. In brief, Sample blends were prepared gravimetrically by the addition of a suitable amount of ⁷⁶SeMet in three 100 mg subsamples of each fish placed into 50 mL plastic tubes. The concentrations of the internal standard solutions used to prepare the blends were such that the ratio of natural/labelled analyte measured on the mass spectrometer was close to unity (±5%). Calibration blends were gravimetrically prepared by the addition of standard solution of SeMet and ⁷⁶SeMet to 50 mL plastic tubes. The remainder of the sample preparation was the same as described above in section 2.4.2.

The concentration of the standard solutions used to prepare the blends was such that the final sample and calibration blend concentrations were equimolar with respect to SeMet. To obtain these exact matching blends, several iterations were required, including an initial assessment to determine the approximate level of SeMet in the sample

The contents of SeMet in each tube were analysed using LC-ICPMS monitoring the isotope ratios $^{78}\text{Se}/^{76}\text{Se}$ and $^{82}\text{Se}/^{76}\text{Se}$). Reversed phase ion pairing HPLC was performed on an Agilent Zorbax Rx-C8 column using a 98 + 2 water-methanol mixture containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA, as ion pairing agent) as the mobile phase at a flow rate of 0.9 mL min^{-1} . The optimum HPLC-ICP-IDMS (isotope dilution mass spectrometry) conditions are summarized in Table 1

3. Results and discussion

3.1. Determination of total Se in muscle fish samples

Total Se concentration in *Clarias gariepinus* muscle was determined after microwave acid digestion by ICP-MS under conditions given in Table 1. The robustness of the microwave-assisted digestion procedure was assessed by using a certified reference material, Antaerctic Krill Murst-ISS A22. As it can be seen in Table 2, Se concentration ($7.42 \pm 0.52 \mu\text{g g}^{-1}$) was in agreement with the certified value. The results obtained after analyzing lyophilized muscle samples of *Clarias gariepinus* showed that Se levels, between $6.2 \pm 0.4 \mu\text{g g}^{-1}$ and $15.5 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$, were high in comparison with the average values found in other freshwater fish. In the Savannah River (USA), Burger et al. found levels of selenium in fish muscle tissues in the range of $0.21\text{-}0.64 \mu\text{g g}^{-1}$ [8]. It is reported that selenium concentrations in muscle tissue reflect the level of this element in the geographic area or the amount taken up through trophic chain. In previous studies, Cabañero et al. determined the amount of Se present in fish samples commonly consumed in Spain and Portugal, and the average values found in sardine, swordfish, and tuna did not exceed the concentration of $0.92 \pm 0.01 \mu\text{g Se g}^{-1}$ [26].

In this study, defatting procedure was performed based on leaching the lyophilized fish samples with different volumes of cyclohexane. It was found that the selenium determined in the dried residue accounted for 100% of the selenium initially present. Therefore, the defatting protocol did not result in any loss of Se. It is important to

remark that defatting procedure was necessary in order to avoid matrix effect in total Se determination and to remove the lipids prior to speciation analysis (the presence of lipids might lead to the fouling of the chromatographic column).

3.2. Enzymatic hydrolysis of Se-compounds in fish samples

In the present work, an effort on reducing the duration of conventional enzymatic hydrolysis was made by evaluating the capabilities of quantitatively extract Se-compounds from a complex matrix such as fish samples. In order to do this, parameters such as sample to enzyme mass ratio, extracting media and urea concentration, which have been found to affect the efficiency of Se-compounds extraction, were optimized. The extraction recoveries were calculated by comparing with the results obtained using a conventional enzymatic hydrolysis in an oven at controlled temperature.

As a first step, the effect of sample to enzyme mass ratio on the selenium extraction efficiency was studied by using three sample/ pronase E ratios (2.5:1, 5:1 and 10:1), in two extracting media: 50 mM phosphate buffer solution (D, E, F) and 7 M urea in 0.1 M Tris-HCl buffer solution (A, B, C), both at pH 7, and by applying the three extraction methodologies mentioned above: ultrasonic-assisted enzymatic extraction (UAEE) (using a ultrasonic probe), microwave-assisted enzymatic extraction (MAEE) and conventional enzymatic hydrolysis (incubation at controlled temperature). All the mixtures were incubated at 37°C using a total extraction time of 30min, 5 min and 24 hours for MAEE, UAEE and conventional enzymatic hydrolysis, respectively

As it is shown in Fig. 1, a 2.5:1 sample/pronase E mass ratio led to an increase in the recovery of selenium from fish muscle. As it is noted, the effect of pronase E is largely influenced by the nature of the extracting media employed. In this respect the extraction efficiencies obtained were higher when 2.5:1 sample/pronase E ratio was added to 7 M urea solution in comparison with the use of phosphate buffer solution. Generally, selenium in biological samples is bound to proteins and peptides, with the consequent need for cleavage of these structures in order to obtain a quantitative extraction. Because of this, urea was added to Tris-HCl buffer solution since it is usually employed as denaturing agent in protein extraction protocols.

Besides evaluating the effect of extracting media, this preliminary experiment suggested that all the methodologies employed led to approximately similar extraction efficiencies, being the higher recovery values those provide by MAEE and UAEE with the consequent reduction of sample treatment time (30 and 2 minutes, respectively).

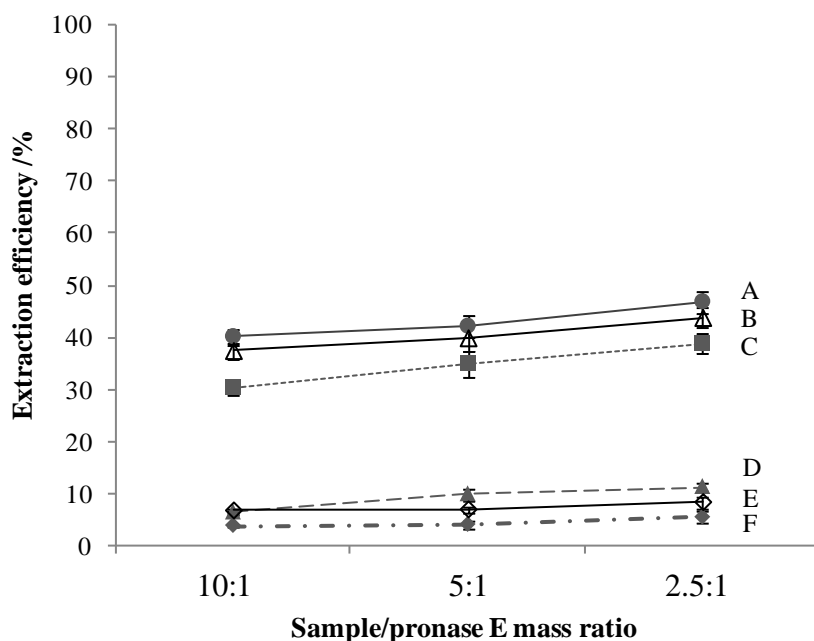


Fig. 1. Selenium extraction efficiency obtained for different sample/pronase E mass ratio in two extracting media. 7 M urea in 0.1M Tris-HCl buffer solution at pH 7.5 (A, B and C trends) and 50mM phosphate buffer solution at pH 7.5 (D, E and F trends), and using different extraction methodologies: incubation for 24 h at 37 °C (C and F trends), microwave-assisted extraction (MAEE) for 30 min (A and D trends), and ultrasonic-assisted enzymatic extraction (UAEE) using a ultrasonic probe for 5 min (B and E trends).

However, the highest percentage of extraction efficiency was only of a $50 \pm 2\%$. In order to improve the efficiency recovery a method which combines proteolytic (pronase E) and lipidic (lipase VII) degrading enzymes was tested. For this purpose, samples were treated with 40 mg of pronase E (corresponding to 2.5:1 sample/enzyme mass ratio) and varying amounts of lipase VII (5 mg and 10 mg). No significant differences were found in the extraction recovery of Se using either pronase E or pronase E/lipase mixture (data not shown), which it might indicate that Se seems not to be bound to lipidic fraction in this kind of matrix.

As a step further, the effect of urea concentration on selenium efficiency was investigated. As it was commented before, whereas an $11.3\pm 0.9\%$ of efficiency extraction was obtained after MAEE and UAEE with phosphate buffer solution, the use of 7 M urea increased the efficiency up to $50\pm 2\%$. Although the use of 7 M urea improved the extraction recovery, the analytical results obtained were still far from being quantitative. This fact may be due to the negative effect of using high urea concentration on enzymatic activity. As it has been reported in the literature, high urea concentrations could decrease enzymatic activity of some enzymes such as pronase E [27,28]. Lipiec et. al. proved that the addition of urea at low concentration in the extracting solution increased the extraction recovery three times, however the use of concentrations up to 1.6 M had a opposite effect on Se recovery [29]. In this study, the use of urea solution in extracting media was evaluated by testing two concentrations: 1 M and 7M. The conclusions cited above led to consider the development of a two-steps enzymatic protocol. First, a 7 M urea solution in Tris-HCl buffer solution at pH 7.5 was added to sample in order to denature protein structure and the mixture was sonicated for 2 min at 40% of ultrasound amplitude (step 1). Then, enzymatic hydrolysis with pronase E (2.5:1 sample/enzyme ratio) was carried out, being necessary the dilution of urea concentration to 1 M (step 2).

Data shown in Fig. 2 indicated that best Se recoveries were achieved by applying the two-step approach (*procedure B*) whereas the efficiency was strongly reduced when hydrolysis was performed when a 7 M urea concentration in Tris-HCl buffer solution was added to sample/pronase E mixture, (*procedure A*). The application of the two-steps approach as extraction protocol increased the Se recovery to $90\pm 2\%$, compared to $29\pm 2\%$ achieved using *procedure A*. These results indicate that the use of an appropriately urea concentration can improve outstandingly the selenium extraction.

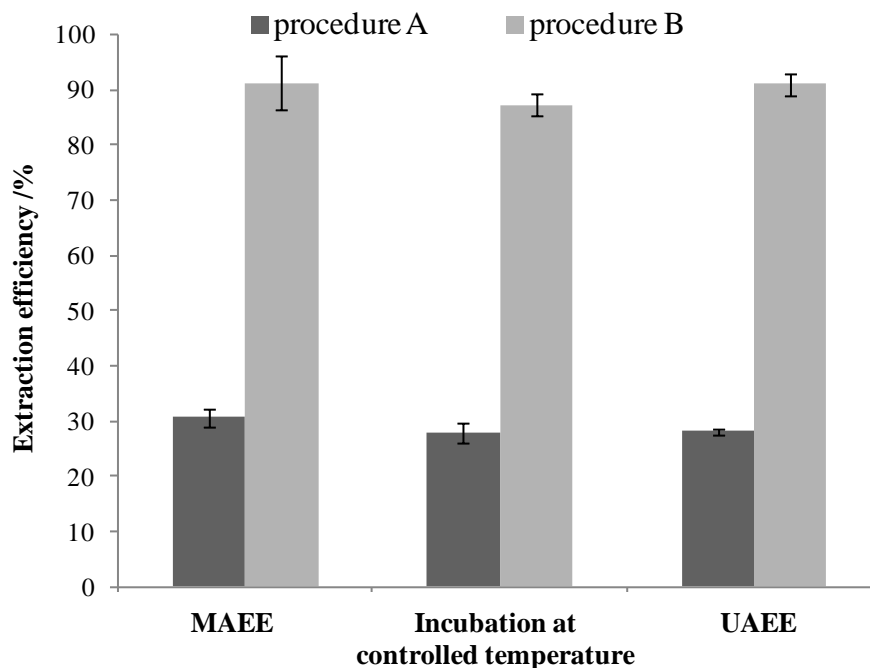


Fig. 2. Selenium extraction efficiency obtained using two enzymatic extraction procedures. PROCEDURE A (light bars): enzymatic extraction in 7 M urea in 0.1M Tris-HCl buffer solution at pH 7.5 and PROCEDURE B(dark bars) consisting in a two-step approach which combines a denaturalization step with a 7 M urea solution in 0.1 M Tris-HCl buffer at pH 7.5 and a proteolytic step with protease previous urea dilution up to 1.5M) with 7 M urea solution (*procedure B*, dark, bars) Different extraction methodologies were applied: microwave-assisted enzymatic extraction for 30 min at 37 °C, incubation at controlled temperature for 24 h, and ultrasound-assisted enzymatic extraction by the use of ultrasonic probe for 4 min.

Finally, the efficiency of the different methodologies tested (MAEE, UAEE and conventional procedure for proteolytic extraction (step 2) were compared. As it can be seen in Fig. 2 no significant differences were found between the extracted Se value by MAEE and the ones provided by using ultrasonic probe or conventional incubation. However, the methodology based on the use of ultrasonic probe was chosen to perform Se extraction from fish muscle samples due to the high extraction efficiency achieved (91±2%) and the significant decrease in the extraction time (4 minutes versus 30 minutes and 24 hours for MAEE and incubation, respectively). Another important

aspect that should be considered in the optimization of extraction methodology is the risk of selenium species interconversion. In this study, no changes in chemical form of selenium were observed after analysis of enzymatic extracts obtained by different methodologies by AE-LC-ICPMS (data not shown). Fig. 3 schematically shows the optimized procedure for quantitatively extracting selenocompounds from fish muscle.

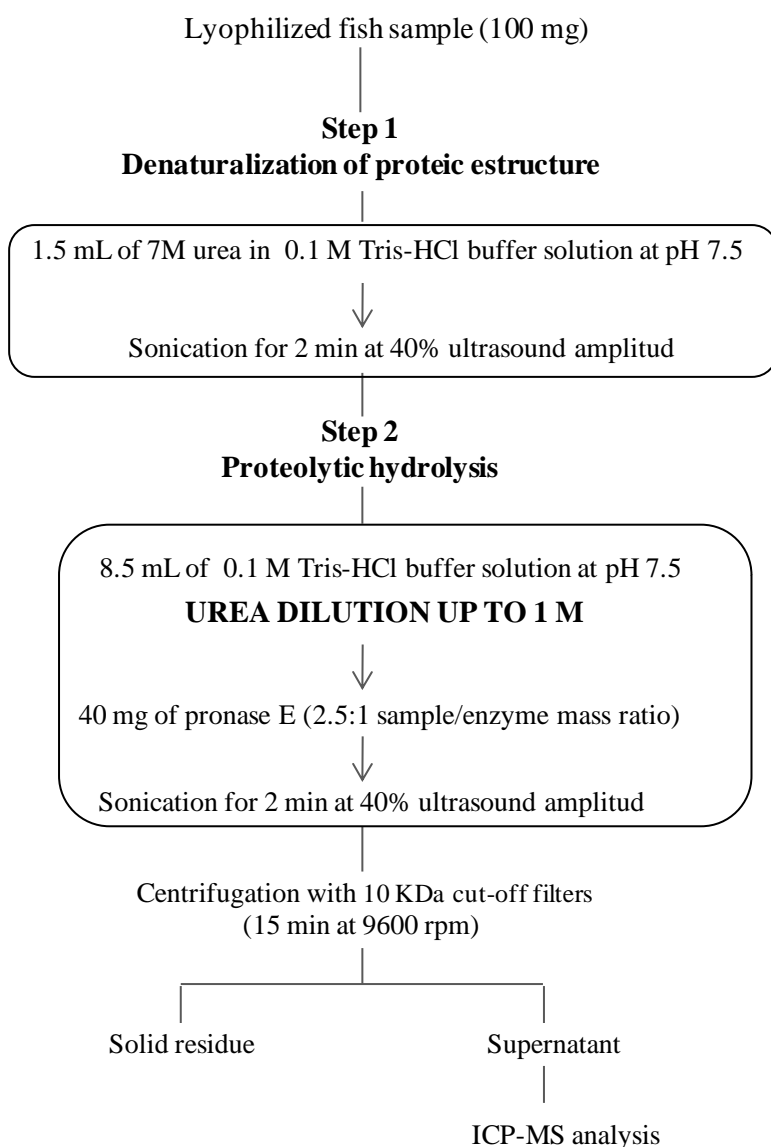


Fig. 3. Scheme of enzymatic extraction procedure applied for extracting Se compounds from fish muscle..

3.3. Screening of selenocompounds in fish muscle by HPLC-ICP-MS

Screening of selenocompounds in the enzymatically hydrolyzed fish extracts was performed by LC coupled to collision/ reaction cell ICPMS. For this purpose, different separation mechanisms: reverse phase (RP), anion exchange (AE) and size exclusion chromatography (SEC), were coupled to the ICPMS following the experimental conditions given in Table 1. It is interesting to note that the sum of Se species detected by AE-LC-ICPMS and RP-LC-ICPMS was much lower than the total Se in the resulting enzymatic extracts of muscle fish. SeMet was the only Se compound detected in the samples, representing 30% of total selenium. Fig. 4 A. and .4 B show the chromatograms of seleno compounds detected in fish muscle after applying the procedure optimized in Fig. 3 by using AE and RP., respectively.

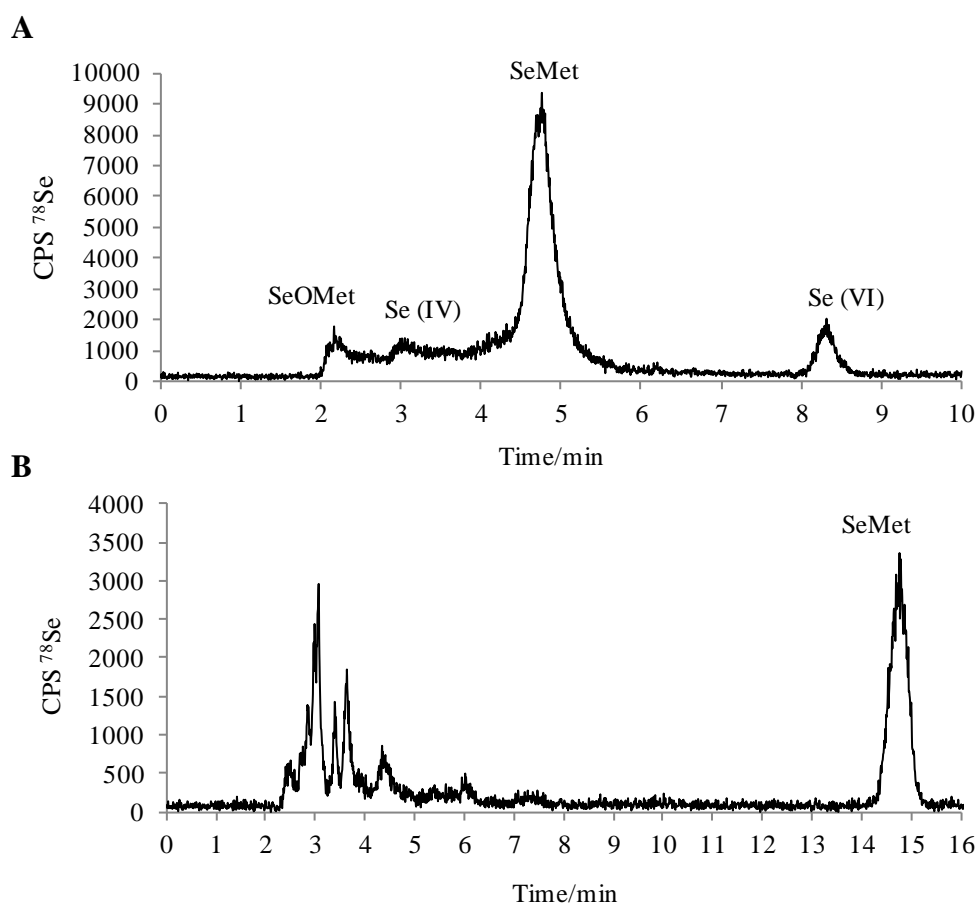


Fig. 4. Chromatographic profiles obtained by anion exchange LC-ICP-MS (A) and reverse phase LC-ICP-MS (B) for ⁷⁸Se corresponding to enzymatically hydrolyzed extracts of lyophilized fish muscle

. These results are in concordance with other reported values appeared in the literature (28% for tuna, 35% for shellfish, 38% for BCR-627 reference material, 56% in shark) after enzymatic hydrolysis [17]. In most studies, however the chromatographic recovery is not reported. It has been demonstrated that during the enzymatic extraction of marine tissues, some Se compounds might remain bound in peptide form, depending on the cleavage specificity of the enzyme and the analyzed fish species.

In order to confirm those results, enzymatic extracts of fish tissue were analyzed by SEC coupled to ICPMS. The molecular weight distribution is presented in Fig. 5A.

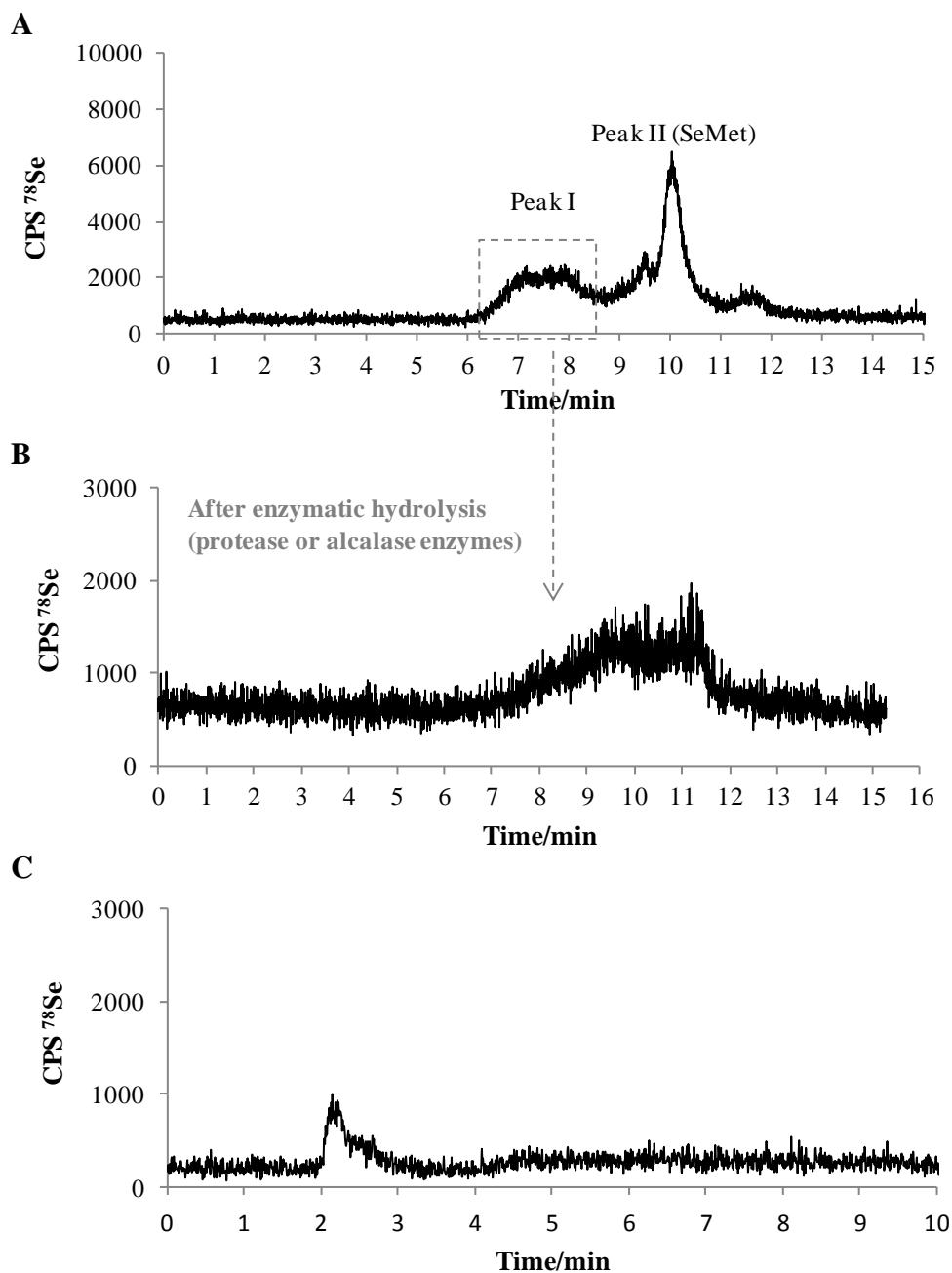


Fig. 5. Chromatographic profile obtained by SEC-ICP-MS for ^{78}Se corresponding to enzymatically hydrolyzed extracts of lyophilized fish samples (A). Chromatographic profile obtained by SEC-ICP-MS for ^{78}Se after a second enzymatic extraction of peak I by using 5:1 sample/alcalase mass ratio (B). Chromatographic profile obtained by

reverse phase LC-ICP-MS for ^{78}Se corresponding to a second enzymatic extraction of peak I by using 5:1 sample/alcalase mass ratio (C)

Selenium appeared associated in the enzymatic extracts to low molecular weight compounds (<5KDa). The low molecular mass range (Peak II) showed the match in retention time of a peak at 8.2 min and SeMet standard, which represented approximately 30% of the total Se in the extract. The results obtained by SEC were in agreement with the data of SeMet quantification obtained previously by either AE or RP separation

On the other hand, fraction corresponding to peak I (from 6.5 min to 9.5 min) represented approximately a 60% of total Se in the extract. Firstly, it was thought that the presence of this broad peak might be due to the fact of some Se compound remain bound in peptide form, depending on the cleavage specificity of the enzyme and the analyzed sample. To investigate the characteristics of this fraction, Se-containing peak I was collected and subjected to a second hydrolysis by using two enzymes: Protease and alcalase. Alcalase was selected for being one of the highly efficient bacterial protease used to prepare functional fish and other protein hidrolizates. Unfortunately, the application of either alcalase or protease does not significantly improve the hydrolysis of the peak I (Fig. 5B). Further, after collecting this fraction and subsequent analysis by RP-LC-ICPMS, the chromatographic profile shows an small peak at the void volume indicating that neither protease nor alcalase were able to hydrolyzed Se-compound presented in Peak 1 either by using MAEE, normal incubation or UAEE.

From our results, the Se-compounds associated to the 5 kDa fraction are resistant to the action of enzymes being responsible of the low recovery values obtained in chromatographic separation by either RP or AE chromatography,. The use of enzymes such as protease or alcalase render to the formation of Se compounds of 5kDa size that corrupt the HPLC chromatographic recoveries.

Besides the presence of Se- amino acids in the extracts, a large portion of the selenium might be associated to other lower molecular weight organic compounds than selenoamino acids and their derivatives and being resistant to the action of enzymes. These findings have been corroborated by other authors. It has been reported that

selenium in the water-extract from the Niboshi a Japanese anchovy (*Engraulis japonicas*) mostly ascribed to organoselenium compounds other than seleno amino acids with a molecular mass less than 5 kDa. Ion-exchange chromatographic separations revealed that most of the selenium species in the extract possess anionic and/or amphoteric characteristics [6]. In flat fish contain low-molecular mass selenium species other than SeCyst and SeMet [12]. Recently, selenonine was separated from the blood of blue tuna fish [16]

3.4 Determination of SeMet in fish muscle using 'exact matching' species specific isotope dilution method with liquid chromatography ICPMS.

As noted earlier SeMet was quantitatively extracted in muscle fish and therefore its quantification was achieved by SSID coupled to LC-ICPMS. To circumvent potential difficulty in mass bias correction, an exact matching approach was applied. The exact matching technique is an iterative process, and, for samples of unknown concentrations, it is necessary to make a preliminary measurement in order to determine the approximate analyte concentration. Using this information samples and standards can be prepared to contain equimolar concentrations of analyte and labelled analogue. Ideally, this results in the ratio measurements for both sample and standard being indistinguishable in a mass spectrometer. As the standard has been gravimetrically prepared the sample concentration can be easily calculated from its measured ratio. Therefore, the concentration of SeMet was first estimated by means of standard addition LC inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICPMS). Samples were extracted following the conditions previously optimized. For the 'exact matching' IDMS procedure a calibration blend was prepared from a standard solution of SeMet and $^{76}\text{SeMet}$ IS solution so that the unlabelled/labelled ratio of the calibration blend matched as closely as possible that of the sample blend, prepared by mixing the fish sample with the same IS solution. The different blends were prepared so that their respective analyte/IS ratios were as close as possible to unity for highest accuracy. The peak areas of the resulting MRM chromatograms were used to calculate the measured ratios of the two isotopic forms ($^{76}\text{SeMet}$ and natural analyte). A RP-LC-ICP-IDMS chromatogram of an enzymatic extract of fish muscle obtained by the extraction procedure previously optimized is shown in Fig. 6.

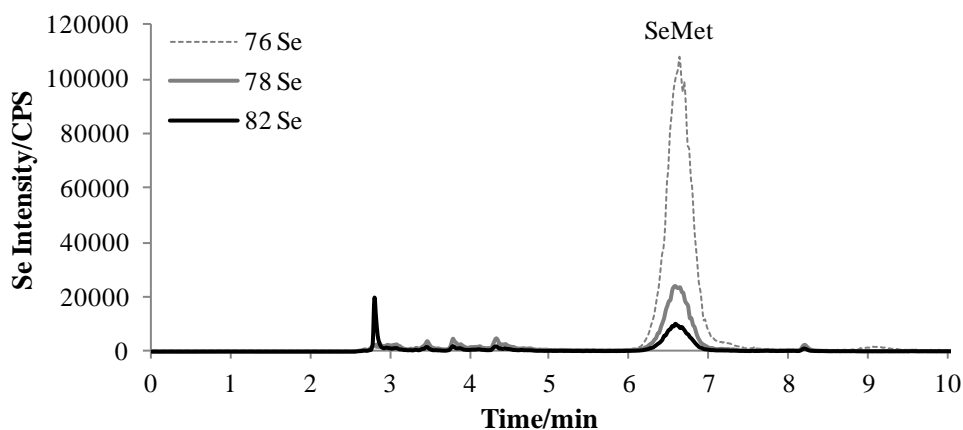


Fig. 6. LC-ICP-IDMS profile of enzymatic extracts of lyophilized fish samples obtained by ultrasound-assisted enzymatic extraction following the procedure schematized in Fig. 3.

Satisfactory degree of the ratio and intensity matching between samples and calibration blends were achieved in the first IDMS iteration. Further improvement in the degree of matching from first iteration to third iteration was observed from 94.8 to 99.4% in isotopic ratio. Concentrations of $1.8 \pm 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ and $2.18 \pm 0.04 \text{ mg kg}^{-1}$ (expanded uncertainty, $k = 2$) for SeMet in two fish samples of fish 1 and fish 2, respectively, were obtained by LC-ICP-IDMS. These results are in good agreement with the recoveries obtained by standard addition LC-ICPMS, 1.6 ± 0.2 and 2.0 ± 0.1 (expanded uncertainty, $k = 2$). To the best of our knowledge, this is first application of species specific isotope dilution for the accurate and precise determination of SeMet in fish muscle.

Conclusions

As it has been mentioned, Se-extraction from fish muscle is not an easy task requiring the use of urea for quantitative extracting the selenium species. Its combination with MAEE and USP dramatically decrease the sample treatment time compared to bath incubation at controlled temperature, 24 h versus 30 and 4 minutes, respectively. In addition, our results strongly indicate the formation of Se-compounds after enzymatic hydrolysis which are responsible of corrupting the chromatographic LC recoveries of

such samples. These 5 kDa Se-compounds seems to be resistant to the action of further enzymatic hydrolysis by using proteases such as Pronase E or alcalase. Further an accurate and precise method is described for the determination of SeMet in fish muscle by using by 'exact matching' species specific isotopic dilution LC-ICPMS. The results obtained were in good agreement by those provided by standard addition LC-ICPMS.

References

- [1] I. López Heras, M. Palomo, Y. Madrid, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 1717–1727.
- [2] Z. Pedrero, Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta* 634 (2009) 135–152.
- [3] E. Schram, Z. Pedrero, C. Cámara, J.W. van der Heul, J.B. Luten, *Aquat. Res.* 39 (2008) 850-860.
- [4] E. Dumont, F. Vanhaecke, R. Cornelis, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 1304-1323.
- [5] A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara, *Anal. Chim. Acta* 526 (2004) 51–61.
- [6] S. Yoshida, M. Haratake, T. Fuchigami, M. Nakayama, *Chem. Pharm. Bull.* 60 (2012) 348-353.
- [7] L. Gong, Q. Xu, C. Lee, H. Zhang, *Eur. Food Res. Technol.* 235 (2012) 169–176.
- [8] J. Burger, K.F. Gaines, W.L. Stephens, C.S. Boring, I.L. Brisbin, L. Snodgrass, J. Peles, L. Bryan, M.H. Smith, M. Gochfeld, *Risk Anal.* 21 (2001) 545-559.
- [9] J. Phibbs, C.I.E. Wiramanaden, D. Hauck, I.J. Pickering, K. Liber, D.M. Janz, *Ecotox. Environ. Safe.* 74 (2011) 1139–1150.
- [10] E.C. Pappa, A.C. Pappas, P.F. Surai, *Sci. Total Environ.* 372 (2006) 100–108.
- [11] M. Sager, *Pure Appl. Chem.* 78 (2006) 111–133.
- [12] SakuraYoshida, Mamoru Haratake, Ta keshi Fuchigami and Morio Nakayama, *Journal of Health Sciences* 57(3), 215-224 (2011)
- [13] Z. Pedrero, S. Murillo, C. Cámara, E. Schram, J.B. Luten, I. Feldmann, N. Jakubowski, Y. Madrid, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 116-125.
- [14] A.I. Cabañero, C. Carvalho, Y. Madrid, C. Batoreu, C. Cámara, *Biol. Trace Elem. Res.* 103 (2005) 17–35.
- [15] P. Moreno, M.A. Quijano, A.M. Gutiérrez, M.C. Pérez-Conde, C. Cámara, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 315–327.
- [16] Y. Yamashita, M. Yamashita, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 18134–18138.

- [17] L. Hinojosa Reyes, J.L. Guzmán Mar, G.M. Mizanur Rahman, B. Seybert, T. Fahrenholz, H.M. Skip Kingston. *Talanta* 78 (2009) 983-990.
- [18] M. Siwek, Boris Galunsky, B. Niemeyer, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 737–741.
- [19] H.R. Fernandez-Torres, M.A. Bello López, M. Olias Consentino, M. Callejón Mochon, M. Ramos Payan. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 1146–1156.
- [20] K.X. Yang, K. Swami, *Spectrochimica Acta Part B* 62 (2007) 1177–1181.
- [21] F.A. Silva, C.C F. Padilha, G. Rocha de Castro, P. dos Santos Roldán, A.R. de Araujo Nogueira, P.M. Moraes, P.M. Padilha, *Cent. Eur. J. Chem.* 9 (2011) 119-125.
- [22] I. Lavilla, P. Vilas, C. Bendicho, *Food Chemistry* 106 (2008) 403–409.
- [23] Y-F. Li, L. Hu, B. Li, X. Huang, E.H. Larsen, Y. Gao, Z. Chaia, C. Chen, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 224-229.
- [24] D. De La Rosa, L. Lima, S. Olivares-Rieumont, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82 (2009) 101-105.
- [25] K. Bierla, J. Szpunar, R. Lobinski, *Anal. Chim. Acta* 624 (2008) 195-202. [26] A.I. Cabañero, C. Carvalho, Y. Madrid, C. Batoréu, C. Cámara, *Biol. Trace Elem. Res.* 101 (2005) 17-35.
- [27] P. Jitaru, H. Goenaga-Infante, S. Vaslín-Reimann, P. Fisicaro, *Anal. Chim. Acta* 657 (2010) 100-107.
- [28] K. Bierla, M. Dernovics, V. Vacchina, J. Szpunar, G. Bertin, R. Lobinski, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1789–1798.
- [29] E. Lipiec, G. Siara, K. Bierla, L. Ouerdane, J Szpunar, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 731-741.

Table 1. ICP-MS instrumental parameters and LC separation conditions

ICP-MS instrumental parameters	
Forward power	1550 W
Plasma gas flow rate	15 L min ⁻¹
Carrier gas flow rate	0.75 L min ⁻¹
Nebulizer gas flow rate	0.83 L min ⁻¹
Dilution gas	0.3 mL min ⁻¹
Sample/skimmer cones	Ni
Collision gas	Hydrogen
Collision gas flow rate	6 mL min ⁻¹
Isotope monitored	⁸² Se, ⁷⁸ Se and ⁷⁶ Se
Dwell time per point	200 ms
Replicates	3
LC separation conditions	
Anion exchange	
Column	Hamilton PRP-X100 (250 x 4.1 mm, 10 μm)
Mobile phase	0.2% citric acid, 2% methanol (pH 5)
Injection volume	100 μL
Flow rate	1 mL min ⁻¹
Column temperature	25 °C
Elution mode	Isocratic
Size exclusion	
Column	BioBasic SEC-60 (300 x 7.8 mm, 5 μm)
Mobile phase	50 mM Tris-HCl buffer, 0.05mM potassium chloride (pH 6.8)
Injection volume	100 μL
Flow rate	1 mL min ⁻¹
Column temperature	25 °C
Elution mode	Isocratic
Reverse phase	
Column	Zorbax Rx-C ₈ (250 x 4.1 mm, 10 μm)
Mobile phase	0.1% trifluoroacetic acid, 2% methanol (pH 2.1)
Injection volume	100 μL
Flow rate	1 mL min ⁻¹
Column temperature	25 °C
Elution mode	Isocratic

Table 2. Total Se concentrations found in lyophilized fish samples and in certified reference material (Antarctic Krill Murst-ISS A22) by ICP-MS after microwave digestion

	Total Se, $\bar{x} \pm s^a$ / $\mu\text{g Se g}^{-1}$	
	Certified value	Concentration found
Antarctic Krill Murst-ISS A22	7.37 ± 0.91	7.42 ± 0.52
Fish 1		6.2 ± 0.4
Fish 2		8.44 ± 0.08
Fish 3		8.6 ± 0.7
Fish 4		11.2 ± 0.2
Fish 5		15.5 ± 0.3

^aAverage value \pm standar desviation (n=3)

Capítulo III. Selenoproteínas

El estudio de las selenoproteínas constituye uno de los temas de mayor interés para una amplia variedad de áreas científicas (bioquímica, medicina, nutrición, epidemiología y química). Se ha demostrado que las selenoproteínas están implicadas en multitud de enfermedades y procesos biológicos, sin embargo, a día de hoy, sigue existiendo controversia entre diferentes autores acerca del papel biológico de algunas de ellas, e incluso algunas funciones todavía no han sido bien establecidas.

En este trabajo ("**Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein Studies**"). Anal. Bioanal. Chem., 400 (2011) 1717) se recoge la información relacionada con las selenoproteínas mejor caracterizadas, así como las contribuciones más importantes de la química analítica tanto para el estudio de las selenoproteínas como de las proteínas que contiene Se. Se detalla el empleo de diferentes técnicas analíticas, como la cromatografía multidimensional acoplada a la espectrometría de masas (ICP-MS), la espectrometría de masas en tándem de ionización con electrospray (ESI-MS/MS), la espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) y la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico con ablación láser acoplada a espectrometría de masas (SDS-PAGE-LA-ICP-MS),. Adicionalmente, se discuten los cambios producidos en los últimos años en las técnicas elementales y de elucidación estructural para la determinación de selenoproteínas.

Los estudios recogidos en este trabajo concluyen que la combinación de la información derivada de estudios de especiación, y la obtenida de ensayos de biología molecular, es necesaria para profundizar en las funciones biológicas de las selenoproteínas.

III.1. Selenoproteínas: El Factor Clave en la Esencialidad del Selenio. Estado de las Técnicas Analíticas más Avanzadas para el Estudio de las Selenoproteínas

“Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein Studies”

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 400 (2011)1717.

Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies

Isabel Lopez Heras · Maria Palomo · Yolanda Madrid

Received: 29 December 2010 / Revised: 10 March 2011 / Accepted: 14 March 2011 / Published online: 1 April 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Selenium is an essential element for human health. The benefits of selenium are many including protection against cancer, heart diseases and other cardiovascular and muscle disorders. Selenium is also helpful in controlling gastrointestinal disorders, enhancing immunity of the human body and reducing age-related diseases. The health-promoting properties of Se are due to vital functions of selenoproteins in which selenium is present as selenocysteine, the 21st amino acid. To date, dozens of selenoprotein families have been described though many have roles that have not been fully elucidated. Selenoproteins research has attracted tremendous interest from different scientific areas. Analytical chemists have not remained indifferent to the attractive features of these unique proteins. Different analytical techniques, such as multidimensional chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS), electrospray (tandem) mass spectrometry (ESI-MS/MS), matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight (MALDI-TOF) and sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis–laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (SDS-PAGE-LA-ICPMS), have been applied to the determination of selenoproteins and selenium-containing proteins. This review describes the best-characterized selenoproteins to date in addition to the major contributions of analytical chemistry to the field of selenoproteins. The article also highlights the challenges of combining elemental and molecular mass spectrometry for the determination of selenoproteins and selenium-containing proteins.

Keywords Mass spectrometry / ICP-MS · Genomics / Proteomics · Bioanalytical methods · Speciation

Introduction

Selenium (Se) is an essential element for human health. Historically, it was considered to be a toxic agent in mammals. However, Schwarz and Foltz [1] reported in 1958 that selenium prevented liver necrosis in rats under vitamin E deficiency. This finding together with a report [2] that highlights the importance of selenium when *Escherichia coli* is grown anaerobically in the presence of glucose supports the consideration of selenium as an essential nutrient for mammals and for certain bacteria. Later it was revealed that selenium deficiency was the cause of several disorders in animals, such as white muscle disease, in addition to contributing to Keshan disease in humans [3]. Currently, the essentiality of selenium is beyond doubt and its effect on the appearance of several diseases has been reviewed extensively in the literature [4–8]. Selenium deficiency in addition to mutations or polymorphisms in selenoprotein genes and synthesis cofactors are all factors involved in a wide variety of diseases, such as muscle and cardiovascular disorders, immune dysfunction, cancer, and neurological and endocrine function disorders.

On the basis of the aforementioned evidence, it is no wonder that selenium biochemistry has developed rapidly in the last 30 years. Selenoproteins and selenium metabolomics studies have also attracted the interest of the analytical chemistry community. Different analytical techniques, such as multidimensional chromatography–ICPMS (inductively coupled plasma mass spectrometry), electrospray (tandem) mass spectrometry (ES-MS, ES-MS/MS), matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight

I. L. Heras · M. Palomo · Y. Madrid (✉)
Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Complutense de Madrid,
Avda. Complutense s/n,
28040 Madrid, Spain
e-mail: ymadrid@quim.ucm.es

(MALDI-TOF) and sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)–laser ablation inductively coupled plasma (LA-ICPMS), have been applied in selenoproteomics studies. This review is an attempt to combine the knowledge from these two related areas by describing the best-characterized selenoproteins to date in addition to the major contributions of analytical chemistry to the field of selenoproteins. For this purpose, the review has been divided into two parts. The first describes selenoproteins and their effect on health in addition to such controversial issues as selenium supplementation and clinical trials. The second part outlines the advantages and limitations of the most relevant analytical techniques used for the study of selenoproteins.

Selenoproteins—the key factor in selenium essentiality

Selenocysteine (SeCys)-containing proteins are called selenoproteins (selenomethionine-containing proteins are not regarded as selenoproteins because of the non-specific nature of Se utilization in these proteins). Selenium is incorporated into proteins not simply through ionic association, as most metals are, but is covalently bonded within the amino acid SeCys (selenocysteine), the 21st amino acid. To date, dozens of selenoprotein families have been described though many have roles that have not been elucidated.

The starting point for the foundation of the molecular biology of selenium took place in 1973 when two independent groups found that selenium was an essential component in mammalian glutathione peroxidase [9, 10]. In both cases, the selenocysteine moiety in the protein coincided with a TGA codon in the corresponding gene. Selenoproteins are present in all three domains of life: bacteria, archaea and eukaryota. However, some organisms do not use SeCys. For example, yeast and higher plants lost the SeCys insertion machinery during evolution and, therefore, do not possess selenoproteins; in these organisms, cysteine-containing homologues of some selenoproteins are utilized instead. Most of the selenoproteins can be classified into two groups according to the location of the selenocysteine in the selenoprotein polypeptide. In group I, selenocysteine is located on the N-terminal position of the function domain. Selenoproteins such as glutathione peroxidases (GPx) and selenoprotein W belong to this group. In group II, selenocysteine is present on the C-terminal sequence as occurs in the thioredoxin reductases family.

The development of genomics techniques and the completion of the human genome project have led to the identification of dozens of families of selenoproteins and more will probably appear in the future. The size of the selenoproteome varies significantly among organisms, with

aquatic organisms having a larger number of selenoproteins. The human selenoproteome contains 25 known selenoprotein genes comprising five SeCys-containing glutathione peroxidases (GPxs), three thioredoxin reductases (TRxRs), three iodothyronine deiodinases (DIOs), selenoprotein W, selenoprotein SeIP, SPS2, Sep15, SelM, MsrB1 as well as selenoproteins I, N, O, H, T, K and S [11]. Rodents and humans have most selenoproteins in common except GPx6. Human GPx6 is a selenoprotein, but in rodents SeCys has been replaced by Cys. Fish have the same number of selenoprotein families as the human selenoproteome. But fish also have several selenoproteins (Fep15, SelJ, SelL) that are not in mammals, as well as several SeCys-containing copies of selenoproteins T, U and W, and two forms of SeIP [11]. Neither selenoproteins nor SeCys insertion machinery have been detected in the genome of the fungus, which is consistent with the idea that selenoprotein genes were lost at the base of the kingdom of fungi. Similarly, whereas large selenoproteomes appeared in *Chlamydomonas*, *Volvox* and *Ostreococcus*, higher plants such as *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* have completely lost both selenoproteins and SeCys insertion machinery [12].

Selenoproteins are a thousand times more effective in catalysis than their cysteine homologues [13]. Besides the close resemblance between selenium and sulphur, the selenium atom gives SeCys quite different properties from Cys. SeCys is a stronger nucleophile than the less reactive Cys, which means that selenoproteins have higher reaction rates with electrophilic substrates [14]. The greater effectiveness of SeCys in catalysis is likely one of the major reasons that nature has invested in evolving Se-dependent pathways [12].

As was previously mentioned dozens of selenoproteins have been discovered but not all are well characterized. Table 1 shows the best-characterized selenoproteins to date in addition to the diseases in which selenoproteins are known to be involved.

Effect of selenium supplementation on cancer prevention

The important role of selenoproteins in metabolism is illustrated by the adverse consequences of selenium deficiency in human and animal health. Selenium deficiency decreases selenoprotein expression, thus altering the biological processes in which they are involved, and therefore promoting the appearance of several diseases. Among the many health benefits attributed to selenium, the one that has attracted the most attention is cancer prevention. Much has been written about selenium as a cancer-preventative agent, and many clinical trials with thousands of subjects administered with selenium supplemented diets have been undertaken.

Table 1 Examples of selenoproteins in human diseases

Selenoproteins	Functions	Disorder	Remarks	References
<p>Glutathione peroxidases (GPx)</p> <p>Six isoforms are found in mammals: GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 and GPx6</p> <p>GPx1, GPx2 and GPx3 are antioxidants found in cell cytosol, gastrointestinal tract and plasma, respectively</p> <p>GPx4 (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) specifically reduces fatty acid hydroperoxides to phospholipids</p> <p>Thioredoxin reductases (TRxRs)</p> <p>Three isoforms are found in mammals: cytosolic TRxR1, mitochondrial TRxR2, and TGR expressed in testis</p> <p>Iodothyronine deiodinases (DIOS)</p> <p>Three isoforms are found in mammals: D1, D2 and D3</p> <p>Selenoprotein P (SeP)</p> <p>It is the most abundant protein in plasma</p> <p>Selenoprotein W (SeW)</p> <p>It is located in cytosolic compartments</p> <p>Selenophosphatase synthetases (SPSs)</p> <p>SPS1 and SPS2 are found in vertebrates and insects, SPS1 being considered as the only selenoprotein</p> <p>Sep15 (15 kDa selenoprotein)</p> <p>It exists in a complex with UGTR, a protein located in the endoplasmic reticulum (ER) of mammalian cells</p> <p>SeIH (selenoprotein H)</p> <p>It is a nuclear-located DNA-binding protein</p>	<p>Oxidative stress</p> <p>Viral gene expression</p> <p>Oxidative stress</p> <p>Viral gene expression</p> <p>Thyroid hormone production</p> <p>Oxidative stress</p> <p>Metal detoxification</p> <p>Oxidative stress</p> <p>Selenoproteins synthesis</p> <p>Various</p> <p>Removal of misfolded proteins from ER membrane</p> <p>Transcription factor</p> <p>Selenoprotein regulation in response to stress</p>	<p>Cardiovascular diseases</p> <p>Cancer</p> <p>Epilepsy</p> <p>Immune disorders</p> <p>Keshan disease</p> <p>HIV</p> <p>Cancer</p> <p>HIV</p> <p>Kashin-Beck disease</p> <p>Thyroid dysfunction</p> <p>Cancer</p> <p>Neurodegeneration</p> <p>Alzheimer's disease</p> <p>Muscle disorder</p> <p>White muscle disease</p> <p>Neurogeneration</p> <p>Thyroid dysfunction</p> <p>Cancer</p> <p>???</p>	<p>GPx3 is considered as a bioindicator of selenium status, correlated with nutrition</p> <p>TRx system is overexpressed in many tumour and cancer cell lines and is therefore considered as a target for anticancer therapy</p> <p>TRxR2 is the only selenoprotein found in <i>Caenorhabditis elegans</i></p> <p>SeP is considered as a bioindicator of selenium status, correlated with nutrition</p> <p>SeP expression in brain may increase with the aging</p> <p>SeW mRNA is highly expressed in the developing central nervous system</p> <p>SPS2 is the only protein involved in the synthesis of SeP (selenium phosphate, the selenium donor needed for selenocysteine synthesis) SPS2 whereas SPS1 has a role unrelated to selenoproteins</p> <p>The development of cancer has been correlated with Sep15 polymorphisms</p>	<p>[10, 15–18]</p> <p>[19–21]</p> <p>[22, 23]</p> <p>[24–29]</p> <p>[30]</p> <p>[31]</p> <p>[32–34]</p> <p>[35]</p>

Table 1 (continued)

Selenoproteins	Functions	Disorder	Remarks	References
Sel I (selenoprotein I) It is the form in which the enzyme ethanolamine phosphor transferase is found in mammals SelR/SelX (selenoprotein R and selenoprotein X)	Phospholipids synthesis	???		[36]
This protein belongs to the family of methionine sulphoxide reductases SelN (selenoprotein N)	Reduction of methyl sulphoxy groups			[36]
It is located in the ER of mammalian cells	Calcium signalling	Multimicore diseases Rigid spine and muscular dystrophy	Several inflammatory diseases have been correlated with SelS polymorphisms	[37]
SelS (selenoprotein S) It is located in the ER of mammalian cells	Removal of misfolded proteins from the ER membrane from the ER membrane	Inflammation responses		[38, 39]
SelK, SelM, SelT, SelO and SelV (selenoproteins K, M, T, O and V respectively) They are all located in the ER of mammalian cells	Removal of misfolded proteins from the ER membrane ??	???	Knowledge about the functions and roles of these selenoproteins is very limited	[40]

ER endoplasmic reticulum, *UGTR* UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase

The first double-blind study using selenium as a chemopreventive agent, Nutritional Prevention of Cancer (NPC), was published in 1996 by Clark et al. [40]. A total of 1,312 individuals of both sexes were studied and no significant effects were observed in the incidence of non-melanoma skin cancer after daily supplementation with 200 µg Se/day. On the basis of NPC trial data, 457 men who received such selenium supplementation were compared to 470 men receiving placebo (a 7-year follow-up study), and a significantly lower incidence of prostate, lung and colorectal cancer was observed among those supplemented [41–43]

These early studies suggested that selenium may reduce the risk of different forms of cancer. However, no significant effects on the prevention of prostate cancer were observed in two subsequent trials: a secondary analysis of the NPC [44] as well as the recently reported SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) [45]. These unexpected results were attributed to the different experimental designs used in both trials. Unlike the NPC study, SELECT used purified selenomethionine as supplement instead of selenized yeast. Also, in the SELECT study the possibility that supplementation with selenium increases the risk of type 2 diabetes was suggested for the first time [45].

The manner in which selenium acts in preventing cancer is poorly understood; and there has been considerable discussion whether there are selenium-containing proteins (selenoproteins), low molecular weight (non-protein) selenocompounds, or both that are responsible for preventing cancer. Those in favour of the effectiveness of selenocompounds state Se supplementation as the best way for decreasing cancer incidence even when no correlation has been observed between supplementation and increased levels of selenoproteins in blood and plasma [46–48]. It is interesting to note that all the studies were performed using mice exposed to high concentrations of selenium (significantly higher than the normal dietary intake), and also at a time when the knowledge about the functions of the selenoproteins was very limited. Nowadays selenoprotein functions are better understood and their important role in cancer prevention is irrefutable. Irons et al. [48] by using mouse models postulated the direct role of both selenoproteins and low molecular selenocompounds in cancer prevention. Interestingly, a recent study has shown that some selenoproteins appear to have a ‘split personality’ in having roles both in preventing and promoting cancer. TRxR1 and Sep15 appear to have a role in cancer prevention in normal cells, but in malignant cancer cells reverse their role to promote cancer. Also, against the dominant opinion on the role of selenium in cancer prevention, examples of cancer development inhibition by selenoprotein deficiency have also been reported in mouse models [49, 50]. Finally, not all selenoproteins respond equally to either selenium deficiency or supplementation [51, 52].

These studies highlight the complex nature of selenium in relation to cancer and clearly shown that the role of selenium in cancer prevention is not well understood yet. The role of selenoproteins should be carefully examined to establish whether supplementation is advisable for treatment or prevention of a specific disease. On the other hand, the data obtained from studies performed in humans have suggested that selenium supplementation might increase the risk of type 2 diabetes. Therefore, researchers should be more prudent and wait for additional genetic mechanistic and animal studies before undertaking large and very expensive human trials.

Selenoproteins in analytical chemistry

The study of selenoproteins is a hot research topic as shown in the papers published over the last 10 years (Fig. 1). Selenium research has attracted the interest of many analytical chemists as evidenced by the increasing number of publications in recent years. Selenium speciation has focused mainly on the determination low molecular weight selenocompounds (seleno amino acids and metabolites) in food, feed and biological matrices by using HPLC-ICPMS. In recent years, the characterization of protein-bound trace elements has become one of the most active research areas in analytical chemistry. For this reason, the methodology used in classical proteomics has been gradually incorporated into the analytical speciation studies. The application of both elemental and organic mass spectrometry methods, usually preceded by liquid chromatography or gel electrophoresis techniques, has become the centrepiece of most studies on selenoproteins and selenium-containing proteins. This section includes the most relevant aspects involved in the separation, detection, identification and quantification of selenoproteins and selenium-containing proteins in

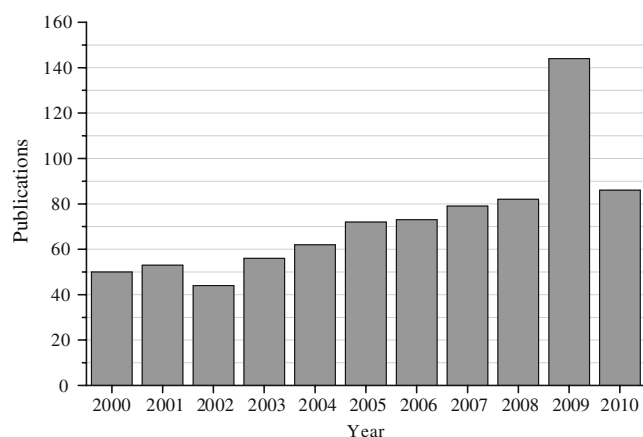


Fig. 1 Selenoprotein studies in scientific publications (2000–2010). Source: ISI Web of Knowledge

addition to issues related with their stability. Table 2 shows selected examples of selenoprotein determinations on the basis of the used of analytical techniques.

Analytical approaches for analysis of selenoproteins and selenium-containing proteins

To date, most of the analytical studies in the field of selenoproteins have focused on the determination of selenoalbumin (SeAlb), SelP and GPx in serum and plasma by using HPLC-ICPMS. These proteins have been used as bioindicators of Se nutritional status, particularly correlated with supplementation. Although SeAlb is not a selenoprotein, it could be considered as a bioindicator of selenium status, because its level decreases with the host's age, whereas this behaviour is not observed for SelP and GPx. The presence of selenoprotein P in human plasma was first reported by using size-exclusion chromatography (SEC) with ICPMS coupling [53]. This methodology was subsequently applied to study selenium screening distribution in animal muscle [54], plants [55], cow serum [56] and chicken liver [57]. However, its lack of resolution for resolving serum GPx from SelAlb makes its application very limited. To overcome this problem, alternative methodologies based on the combination of on-line affinity columns for serum SelAlb, SelP and GPx determination have been reported. The classical approach is based on the use of two affinity columns, a Heparin Sepharose column coupled to a reactive Blue Sepharose column. SelP is selectively retained in the heparin stationary phase whereas SeAlb is retained on the Blue Sepharose stationary phase. GPx is not retained by any of the stationary phases. These two columns have been used for the separation of the mentioned selenoproteins in human serum [58] and plasma [59–61] with atomic absorption spectrometry and ICPMS coupling, respectively. The mayor drawback of this procedure is that GPx elutes in the void volume, co-eluting with unretained salts and all other plasma proteins. The presence of unretained species, such as Cl^- and Br^- , causes serious spectral interferences ($^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$, $^{79}\text{Br}^1\text{H}$ and $^{81}\text{Br}^1\text{H}$), which leads to erroneous results. For example, an overestimation of 300% (^{82}Se) and 400% (^{77}Se) in the determination of GPx concentration in serum has been reported [62] when AF-HPLC was applied without prior removal of Br and Cl interferences. Several studies [62–65] have proposed the use of anion exchange solid-phase extraction (AE-SPE) to selectively remove chlorine- and bromine-containing interferences in human serum. The main drawbacks of these off-line approaches are, however, the introduction of a laborious step into the analytical process. To overcome these problems, the application of a microbore affinity-HPLC (AF-HPLC) hyphenated to inductively coupled plasma-sector field mass spectrometry (ICP-

Table 2 Selected examples of selenoprotein determination on the basis of the used of analytical techniques

Technique	Sample	Procedure	Remarks	References
AF-HPLC-ICPMS, ICPSEMS	Human serum BCR-637 (SeIP, SeAlb and GPx)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Separation and detection of serum proteins by AF-HPLC-ICPMS prior sample clean-up by anion exchange 2. HEP and BLUE columns were used for retention of SeIP and albumin, respectively 3. Quantification of proteins by on-line IDA-ICPMS 	GPx, SeIP and SeAlb were separated and detected by AF-HPLC-ICPMS after removal of Cl and Br interferences by anion exchange	[63]
AF-HPLC-ICPMS	Human serum (SeIP, SeAlb and GPx)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Separation and detection of serum proteins by AF-HPLC-ICPMS prior sample clean-up by anion exchange 2. Quantification of proteins by on-line IDA-ICPMS 	Different chromatographic mechanisms were applied for SeIP, GPx and SeAlb separation	[64]
ICPMS/SFMS, MALDI-TOFMS	Human serum (SeIP, SeAlb and GPx)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Separation and detection of serum proteins by AF-HPLC-ICPMS prior sample clean-up by anion exchange 2. MALDI-TOFMS analysis for structural identification 	An AE-SPE clean-up procedure was validated for GPx, SeAlb and SeIP determination	[65]
AF-HPLC-ICPMS	Human plasma (SeIP)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Separation of SeIP and selenium-containing proteins by using two chromatographic mechanisms: <ol style="list-style-type: none"> a. SEC-ICPMS system and b. AF-HPLC-ICPMS system 	A micro-affinity chromatography system was on-line coupled to ICPMS to determine SeIP as well as Se-containing proteins	[66]
AF-HPLC-ICP-SFMS	Human serum (SeIP, GPx, SeAlb)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Separation and detection of serum proteins by AF-HPLC-ICPMS 2. Quantification of proteins by on-line IDA-ICP-SFMS 	The use of ICP-SFMS allows direct quantification of SeIP, GPx and SeAlb without prior separation for removing interferences	[67]
⁷⁵ Se-labelling/SDS-PAGE/ γ -scintillation counting, RP-HPLC-ICPMS	Rye seedlings (10–85 kDa Se-containing proteins)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparation of Se-enriched and ⁷⁵Se-enriched seedling biomass 2. Determination of Se concentration by HG-ICPMS 3. Separation of Se-containing proteins by SDS-PAGE followed by radioactivity measurements detection 4. Enzymatic hydrolysis of Se-containing proteins 5. Se speciation by RP-HPLC-ICPMS 	The SDS-PAGE technique in combination with RP-HPLC was used to study selenite biotransformation during rye seedlings germination	[70]
2D-SDS-PAGE, MALDI-TOFMS	Mammary cells (MAC-T cells) (GPx, TrxR, SeIP, SeIT, SeIR and SeIH)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 2D electrophoresis separation of proteins followed by autoradiography detection 2. Enzymatic hydrolysis of Se-enriched spots 3. MALDI-TOFMS identification 	An in vitro study based on biosynthesis of selenoproteins by cells incubated in a (⁷⁵ Se) selenite-enriched medium	[71]
SDS-PAGE-LA-ICPMS	Avocet embryo and largemouth mouth bass ovary (GPx and Se-containing proteins)	SDS-PAGE-LA-ICPMS	First application of SDS-PAGE-ICPMS to selenoprotein studies	[72]
SDS-PAGE-LA-ICPMS	human red blood cells and selenized yeast cells and selenized yeast	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aqueous protein extraction from selenized yeast by using aqueous extraction 2. Purification of GPx from red blood cells extracts 3. Derivatization of SeCyst by treatment with DTT and IAM 4. 1- and 2-DE separation for red blood cells and selenized yeast extracted proteins, respectively 	GPx and Se-containing proteins were determined in human red blood cells and selenized yeast, respectively. Two ablation strategies were applied: single hole drilling, relevant for 2D separation, and ablation with translocation, relevant for 1D separation	[73]
LA-ICPMS	GPx standard	SDS-PAGE analysis of a GPx standard	fsLA provides a signal 40 times more intense than that obtained by conventional ns LA	[77]
SDS-PAGE-LA-ICPMS	<i>Escherichia coli</i> and <i>Desulfococcus multivorans</i> (Formate dehydrogenase, and 100 kDa, 30 kDa and 27 kDa proteins)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prefractionation of a <i>E. coli</i> extract by using SEC-ICPMS 2. Analysis by SDS-PAGE -fsLA-ICPMS for selenium-containing protein separation and detection 	Selenoprotein formate dehydrogenase and 100 kDa, 30 kDa and 27 kDa Se-containing proteins were detected in <i>E. coli</i> and <i>D. multivorans</i> respectively	[78]

RP-HPLC-ICPMS, MALDI-TOFMS, ESI-MS/MS	Selenized yeast	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aqueous extraction of selenocompounds from selenized yeast 2. Fractionation of selenocompounds by SEC-ICPMS 3. Tryptic digestion of selenium-containing proteins 5 Se peptides fractionation by RP-HPLC 6. MALDI-TOFMS and ESI-MS/MS identification 	<p>[83, 84]</p> <p>A selenopentapeptide was first identified and sequenced in selenized yeast. In addition a family of Se-containing proteins, named SIP18 and HSP12 proteins, were detected in yeast aqueous extracts</p>
MALDI-TOFMS, nano-ESI-MS/MS	Rat plasma (SeIP and GPx)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Purification of SeIP and isolation of its full-length isoform by AF-HPLC 2. Purification and isolation of GPx by AF-HPLC 3. Deglycosylation of the SeIP full-length isoform 4. Tryptic digestion of selenoproteins 5. Analysis by MALDI-TOF and nano-ESI-MS/MS 	<p>[87]</p> <p>Alkylated SeIP and GPx derivatives were characterized by molecular mass spectrometry</p>
SEC-ICPMS	Human serum (SeIP, GPx, Alb, SeMet, Se(VI) and Se(IV) standards)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Derivatization of GPx with DTT and IAM 2. SEC-ICPMS analysis 	<p>[92]</p> <p>The stability of Se-containing proteins was studied under non-denaturing conditions</p>
AF-HPLC-ICPMS	Human serum (SeI/Alb)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Enzymatic hydrolysis of human serum SeAlb by using protease 2. Quantification of SeMet by SSID with RP-HPLC-ICPMS 	<p>[99]</p> <p>SeMet was quantified in serum samples using SSID and the method was presented as an alternative for quantifying Alb in serum</p>

AF-HPLC affinity-HPLC, *BLUE* Hitrap Blue Sepharose, *DTT* dithiothreitol, *HEP* Hitrap Heparin Sepharose, *HG* hydride generation, *IAM* iodoacetamide, *IDA* isotopic dilution analysis, *ns* nanosecond, *LA* laser ablation, *RP-HPLC* reversed-phase HPLC, *SEC* size-exclusion chromatography, *SSID* species-specific isotope dilution, *SFMS* sector field mass spectrometry

SFMS) for simultaneous analysis of glutathione peroxidase (GPx), selenoprotein P (SeIP) and SeAlb in serum was recently reported [66, 67]. The use of high-resolution ICPMS allows the determination of serum selenoproteins without the need for an additional separation step. However, the instrumentation required is not available for routine analysis in most laboratories.

As shown, methods based on the use of on-line affinity columns are the most widely implemented for determination of selenoproteins in serum/plasma samples. Besides, the promising analytical advances, several aspects such as quantification are still a challenge.

Gel electrophoresis (GE) sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in one- or two-dimensional format is a powerful tool for the separation of selenoproteins and Se-containing proteins. The location of Se-containing bands in 1D GE or spots in 2D GE has been done by using different approaches, such as instrumental neutron activation analysis (INAA), autoradiography of radioactive (e.g. ⁷⁵Se-labelled) species and laser ablation inductively coupled plasma MS (LA-ICPMS). Until recent years, autoradiography was the only technique to detect heteroatoms in proteins previously separated by gel electrophoresis [68]. By using this approach, ⁷⁵Se-containing proteins have been detected in rat tissues [69] and rice [70]. The biosynthesis of selenoproteins in bovine mammary cell line MAC-T was evaluated by using 2D gel electrophoresis followed by autoradiography [71]. For this purpose, cells were allowed to grow for 72 h in serum medium containing [⁷⁵Se]-selenite. A subsequent analysis of the tryptic digests of proteins extracted from ⁷⁵Se-labelled spots with MALDI-TOF evidenced the presence of GPx 1, TrxRs (types 1 and 2), SeIP, DIO, GPx4 and 15 kDa.

In spite of the good results given by the use of 2D electrophoresis followed by autoradiography, the use of ⁷⁵Se isotopes makes the sample handling hazardous and restricts its application to human studies. Laser ablation (LA)-ICPMS seems to be an excellent alternative for selenium detection after SDS-PAGE protein separation. Fan et al. [72] first used SDS-PAGE-LA-ICPMS to identify selenium species in protein extracts from an avocet embryo and a bass ovary collected from Se-enriched waters. Eight and five distinct bands of selenoproteins were revealed, respectively, of which four bands (100, 60, 50 and 48 kDa) were present in both organisms. Later the method was applied to the detection of glutathione peroxidase isolated from red blood cells [73] and for screening selenium proteins in fish tissues [74, 75]

To date SDS-PAGE-LA-ICPMS has proved to be the most appropriate technique for the separation and detection of selenoproteins and selenium-containing proteins. However, the method has failed to detect low levels of selenoproteins. One way to improve sensitivity is the use

of a femtosecond (fs)-LA-ICPMS. Compared to a conventional nanosecond (ns) laser ablation, the signal sensitivity is enhanced 40-fold owing to the increase in the amount of ablated protein per unit time [76, 77]. However, as more matter is ablated, the signal-to-background ratio is considerably higher (ca. 20 times) than in ns LA-ICPMS. Using this methodology the selenoprotein formate dehydrogenase in *Escherichia coli* and two selenoproteins in the sulphate-reducing bacterium *Desulfococcus* [78] has been detected. SDS-LA-ICPMS has also been used for the separation of selenoproteins and selenium-containing proteins in yeast followed by MALDI-TOFMS and ESI-MS/MS identification. Most of the reports have been provided by the group of Lobinski [79–84]. A large part of their contributions concerns the application of a multidimensional approach that involves the following steps: (1) separation of selenoproteins by 1D or 2D gel electrophoresis, (2) specific detection of selenium-rich band or spots by LA-ICPMS, (3) in-gel trypsin digestion of selenium-rich band or spots, (4) application of nano-HPLC-ICPMS for specific mapping of selenopeptides from gel bands or spots and (5) identification of Se peptides by nano-HPLC-ESI-MS/MS. So far, this method has shown a very limited application range, specifically samples other than yeast where Se concentration is higher than 1,000 $\mu\text{g/g}$. The main difficulties of this methodology are due to the low concentration of the selenoprotein and/or selenium-containing protein extracted, combined with suppression of the target analyte ionization by matrix components. Therefore, identification with molecular MS requires the use of multistep sample preparation or preconcentration sample procedures. However, such methods often lead to species transformation. On the other hand, the effective extraction of intact proteins from the gel is a difficult task. The problem arises because the extracted Se-containing proteins are often accompanied at least by their methionine analogues that are more abundant and preferentially ionized. From the foregoing account, it is clear that interest in selenoproteomics has been gradually moving towards selenium metabolomics studies based on the identification of selenium-containing metabolites by electrospray MS following multidimensional purification.

Selenoprotein stability: conversion of selenocysteine into dehydroalanine

At this point, it is worth having a closer look at selenoprotein stability. Selenoproteins, specially GPx and SelP, are readily degraded because of selenocysteine instability. The selenium atom in selenocysteine is more prone to oxidation than that in selenomethionine [85–87]. Selenocysteine is converted to dehydroalanine via oxidation to the selenoxide followed by β -elimination of seleninic

acid. Such β -elimination reactions in seleno amino acids have attracted the interest of some researchers owing to the anticarcinogenic properties attributed to the alkyl selenol products [88, 89]. The enzyme β -lyase was first identified in rat liver and its ability to transform free selenocysteine into alanine and elemental selenium was also described [90]. Later the enzyme was found in the cytosolic fraction of mouse tissues, principally in liver and kidney [91], thus suggesting its role in selenium removal from selenoproteins. The aforementioned evidence clearly shows that GPx and SelP stability is affected by selenocysteine degradation via a β -elimination mechanism. It is therefore necessary to use a sample treatment procedure based on reduction with dithiothreitol (DTT) followed by acetylation with iodoacetamide (IAM) to prevent oxidation of selenocysteine [92], and therefore to adequately determine selenoproteins. The preparation of carbamidomethyl-selenocysteine (CAM-SeCys) requires a huge excess of reagents, the limiting step of the reaction being the reduction of SeCys₂. Therefore, the procedure must ensure the removal of unreacted SeCys₂ in addition to an effective separation of CAM-SeCys from by-products and leftover reagents. Dernovics et al. [93] optimized a method that involves preparation, isolation (cation-exchange chromatography) and characterization (ESI-QTOF-MS/MS) of CAM-SeCys. Briefly, SeCys₂ was first reduced with dithiothreitol and then carbamidomethylated with iodoacetamide. The resulting CAM-SeCys derivative was separated from the unreacted SeCys₂ and iodine species by cation-exchange HPLC. The method was further applied for SeCys speciation in a mixture of selenocysteine-containing glutathione-derived peptides, isolated from Se-enriched yeast. The proteolytic digestion of the mixture of SeCys-containing metabolites with and without carbamidomethylation was monitored by 2D (size-exclusion ion-pairing reversed-phase) HPLC-ICPMS and electrospray MS/MS. The results showed that proteolytic digestion by using protease was unable to liberate SeCys from SeCys-containing oligopeptides, and instead carbamidomethyl-selenoglutathione was detected by MS/MS. These data seriously question the reliability of those studies that state the presence and quantification of selenocysteine in yeast. Through the use of this procedure it was possible to determine selenomethionine and selenocysteine in edible animal tissues [94] and eggs [95]. The end products from carbamidomethylation of the different selenium species were identified by electrospray QTOF-MS. Selenomethionine gave peaks that were attributed to side reactions provoked by the excess of IAM during its derivatization. The method allowed the contribution of selenoproteins (SeCys) and selenium-containing proteins (SeMet) to be distinguished and it was presented as an alternative to Se-proteins identification by ES-MS protocols.

In spite of carbamidomethylation, losses of selenium have been detected in some selenopeptides from SeIP. These unexpected results were attributed to various factors, such as loss of the selenium atom during purification and characterization of selenoproteins and the low efficiency of the acetylation reaction that may cause the presence of free selenocysteine in the sample. Similar findings were obtained for the analysis of GPx in rat plasma [87].

Because of the limited stability of selenocysteine, selenoprotein determination requires more careful attention than the analysis of selenomethionine-containing proteins. Carbamidomethylation appears to be an essential step to protect selenol groups in SeCys-containing selenoproteins; however, the derivatization agent could react with selenomethionine and/or excess of reagents, causing artefact peaks that could alter the derivatization efficiency and prevent the subsequent identification. For all cases mentioned, multidimensional chromatography schemes followed by ICPMS and ESI-MS/MS should be applied to control the performance of the reaction [96].

ICPMS for quantification of selenoproteins and selenium-containing proteins

Despite the promising achievements in the application of analytical techniques for selenoprotein separation and detection, quantitative determination of selenoproteins is not a straightforward task because of the lack of reference materials for method validation and the poor stability of selenoproteins. Most of the studies reported have focused on quantification of proteins in serum by using post-column isotope dilution and ICPMS. The use of isotopic dilution analysis (IDA)-ICPMS for quantitative analysis of proteins has been summarized in recent reviews [97, 98]. In this methodology, an isotopically enriched spike of the element to be determined (in a chemical form that can be different from that of the analyte) is added post-column. The procedure allowed the quantitative determination of endogenous trace elements in biomolecules of unknown identity. Hinojosa Reyes et al. [63] succeeded in determining selenium in human serum by affinity chromatography (Hi-Trap Heparin- and Hi-Trap Blue-Sepharose columns) coupled to ICPMS with an octapole reaction system (ORS). Selenium quantification was performed by post-column IDA by continuous mixing of an enriched ^{77}Se spike solution with the eluent from the column. Finally, the $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ or $^{80}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ isotope ratios were monitored and the amount of selenium bound to proteins was evaluated. Three main selenium fractions were separated and quantified: selenoprotein P, albumin and glutathione peroxidase. The performance of mass balance under different experimental conditions showed a quantitative selenium recovery. The proposed methodology was applied to selenium

speciation in human serum samples from healthy volunteers and patients on haemodialysis. The method has been extensively applied to the quantification of GPx, SeIP and SeAlb in human serum [62, 67, 99] and plasma [100]. Although affinity-HPLC (AF-HPLC) with on-line post-column isotope dilution ICPMS coupling has been shown to provide the more selective separation and accurate quantification of selenoproteins in serum, in comparison with approaches based on size exclusion and calculations of selenium peak area distribution, there are still remaining challenges. Post-column IDMS calibration does not account for any analyte losses or transformation occurring during sample preparation or species separation. This fact should be taken into account because of the selenoprotein instability. On the other hand, the lack of speciated certified reference materials makes a proper method validation difficult. Jitaru et al. [99] addressed an alternative approach for the determination of selenium in human serum selenoalbumin consisting of enzymatic hydrolysis of the whole serum followed by the determination and quantification of SeMet by using species-specific isotopic dilution (SSID) with RP-HPLC hyphenated to ICPMS. Although this methodology cannot be used to distinguish between selenium associated with SeIP and GPx, it could be considered as an alternative for the accurate quantification of SeAlb for serum samples that do not contain free SeMet.

Conclusions

The study of selenoproteins is a topic of special interest for many scientific areas, such as biochemistry, medicine, nutrition, epidemiology and chemistry. Selenoproteins are implicated in a variety of diseases; however, the functions of some of the selenoproteins are still controversial or remain unknown. At the last International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, "Selenium 2010" held in Kyoto (Japan), the following challenges were raised: (1) Improve knowledge about the mechanisms of individual selenoprotein synthesis and (2) establish the efficiency of selenium supplementation to prevent cancer and improve selenium status in the selenium-deficient population. It has been shown that selenium status affects expression of individual selenoproteins differently. Furthermore, examples of inhibition of cancer development by selenoprotein deficiency have also been given [50]. Controversy also exists over whether Se administration predisposes one to diabetes and other metabolic effects. So knowledge about the effect of selenium status on gene expression and metabolism obtained by using animal models is critical to accurately predict the effect of selenium supplementation.

Compared with the amount of data based on the use of genomics and bioinformatics tools, relatively few cases

have addressed the use of ICPMS-based techniques for selenoprotein studies. ICPMS methods usually preceded by a separation step are the centrepiece of most selenium speciation studies. In particular, LA-ICPMS has been shown as an excellent tool for selenium detection after SDS-PAGE protein separation; however, the further application of ESI-MS/MS or MALDI-TOF usually fails for selenoprotein identification. The lack of sensitivity of molecular MS analysis combined with the ion suppression from the sample matrix requires the application of multistep sample preparation or preconcentration procedures. On the other hand, selenoprotein quantification is still a challenge. Post-column IDMS calibration does not account for any analyte losses or transformation occurring during sample preparation or species separation and there are no speciated reference materials for method validation.

The complexity of the task makes the determination of selenoproteins an almost impossible objective. An alternative method to the identification of Se-proteins by using ES-MS protocols could be the determination of SeCys and SeMet to differentiate between the contribution of selenoproteins and selenium-containing proteins, respectively. At this point, the remaining question is, therefore: can ICPMS-based techniques provide useful data for understanding selenoproteins' functions and roles? Giving an affirmative answer to this question requires advances in the simplification and efficiency of sample preparation as well as in the detection capabilities of MS spectrometers. Advances in mass spectrometric analyzers and tandem MS and MSⁿ will result in fast identification of selenoproteins in a great variety of biological samples. Furthermore, the integration of both ion sources (ICPMS and ESI-MS/MS) in one instrument has been recently reported [101, 102]. The use of nano-HPLC with the parallel ICPMS and electrospray MS/MS is a valuable tool for specific mapping of selenopeptides and subsequent selenopeptide identification from gel bands or spots. However, interfaces for standard coupling nano-HPLC to ICPMS are not commercially available yet, thus limiting the use of the method for routine purposes. Also, speciated certified reference need to be produced for measurement validation and quality control of proteins in serum.

Finally, more cooperation based on the analytical expertise obtained from selenium speciation studies combined with the expertise obtained from molecular biology experiments will probably provide a better understanding of the functions and roles of selenoproteins. Despite the interest shown by analytical researchers on selenium speciation, very few attend conferences devoted to selenium biochemistry or related areas. Selenoproteins and selenoproteomics is a multidisciplinary area which needs the participation of all researchers for a correct and unambiguous interpretation of the results.

Acknowledgements The authors acknowledge the financial support of the Spanish MICINN (Ministry for Science and Innovation and Regional Government of Madrid) through the projects CTQ-2008-05925 and CAM-S2009/AGR/1464.

References

- Schwarz K, Foltz CM (1958) *J Biol Chem* 233:245–251
- Pinsent J (1954) *Biochem J* 57:10–16
- Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK (2007) *Antioxid Redox Signal* 9:775–806
- Boosalis MG (2008) *Nutr Clin Pract* 23:152–160
- Lu I, Holmgren A (2009) *J Biol Chem* 284(2):723–728
- Rayman MP (2000) *Lancet* 356:233–241
- Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ (2009) *Biochem J* 422:11–22
- Latreche L, Chavatte L (2008) *Met Ions Biol Med* 10:731–737
- Rotruck J, Pope A, Ganther HE, Swason AB, Hafeman DG, Hoestra WG (1973) *Science* 179:588–590
- Flohé L, Gunzler WA, Schock HH (1973) *FEBS Lett* 32:132–134
- Kryukov GV, Castellano S, Novolyselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN (2003) *Science* 300:1439–1443
- Castellano S (2009) *Biochim Biophys Acta* 1790:1463–1470
- Arner ESJ (2010) *Exp Cell Res* 316:1296–1303
- Johansson L, Gafvelin G, Arner ESJ (2005) *Biochim Biophys Acta* 1726:1–13
- Arthur JR (2000) *Cell Mol Life Sci* 57:1825–1835
- Rayman MP (2009) *Biochim Biophys Acta* 1790:1533–1540
- Hoffmann PR (2007) *Arch Immunol Ther Exp* 55:289–297
- Lillig CH, Holmgren A (2007) *Antioxid Redox Signal* 9:25–47
- Anestal K, Prast-Nielsen S, Cenas N, Arnér ESJ (2008) *PLoS ONE* 3(4):1–16
- Buettner C, Harney JW, Berry MJ (1999) *J Biol Chem* 274:21598–21602
- Beckett GJ, Arthur JR (2005) *J Endocrinol* 184:455–465
- Kohrl J (2000) *Cell Mol Life Sci* 57:1853–1863
- Motsenbocker MA, Tappel AL (1982) *Biochim Biophys Acta* 719:147–153
- Burk RF, Hill KE (2005) *Annu Rev Nutr* 25:215–235
- Scharpf M, Schweizer U, Arzberger T, Roggendorf W, Schomburg L, Kohrle J (2007) *J Neural Transm* 114:877–884
- Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan, Yankner BA (2004) *Nature* 429:883–891
- Bellinger FP, He QP, Bellinger MT, Lin Y, Raman AV, White LR, Berry MJ (2008) *J Alzheimers Dis* 15:465–472
- Xia Y, Hill KE, Li P, Dingyou Zhou JX, Motley AK, Wang L, Byrne DW, Burk RF (2010) *Am J Clin Nutr* 92(3):525–531
- Vendeland SC, Beilstein MA, Chen CL, Jensen ON, Barofsky E, Whanger PD (1993) *J Biol Chem* 268:17103–17107
- Squires JE, Berry MJ (2008) *IUBMB Life* 60:232–235
- Gladyshev VN, Jeang KT, Wootton JC, Hatfield DL (1998) *J Biol Chem* 273:8910–8915
- Kumaraswamy E, Malykh A, Korotkov KV, Kozyavkin S, Hu Y, Kwon SY, Moustafa ME, Carlson BA, Berry MJ, Lee BJ, Hatfield DL, Diamond AM, Gladyshev VN (2000) *J Biol Chem* 275:35540–35547
- Jablonska E, Gromadzinska J, Sobala W, Reszka E, Wasowicz W (2008) *Eur J Nutr* 47:47–54
- Panee J, Stoytchev Z, Liu W, Berry M (2007) *J Biol Chem* 282:23759–23765
- Horibata Y, Hirabayashi Y (2007) *J Lipid Res* 48:503–508
- Ferreiro A, Quijano-Roy S, Pichereau C, Moghadaszadeh B, Goemans N, Bonnemann C, Jungbluth H, Straub V, Villanova M, LeRoy JP (2002) *Am J Hum Genet* 71:739–741

37. Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA (2004) *Nature* 429:841–847
38. Curran JE, Jowett JB, Elliott KS, Gao Y, Gluschenko K, Wang J, Abel Azim DM, Cai G, Mahaney MC, Comuzzie AG (2005) *Nat Genet* 37:1234–1241
39. Reeves MA, Hoffmann PR (2009) *Cell Mol Life Sci*. doi:10.1007/s00018-009-0032-4
40. Clark LC, Combs GF, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J (1996) *JAMA* 276:1957–1963
41. Duffield-Lillico AJ, Reid ME, Turnbull BW, Combs GF Jr, Slate EH, Fischbach LA (2002) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:630–639
42. Duffield-Lillico AJ, Dalkin BL, Reid ME, Turnbull BW, Slate EH, Jacobs ET, Marshall JR, Clark LC (2003) *BJU Int* 91:608–612
43. Stranges S, Marshall JR, Natarajan R, Donahue RP, Trevisan M, Combs GF, Cappuccio FP, Ceriello A, Reid ME (2007) *Ann Intern Med* 147:217–223
44. Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, Lucia MS, Thompson IM, Ford LG, Parnes HL, Minasian LM, Gaziano JM, Hartline JA (2009) *JAMA* 301:39–51
45. Ip C, Dong Y, Ganther HE (2002) *Metastasis Rev* 21:281–289
46. Rayman MP (2005) *Proc Nutr Soc* 64:527–542
47. Brigelius-Flohé R (2008) *Chem Biodivers* 5:389–395
48. Irons CD, Carlson BA, Hatfield DL (2006) *J Nutr* 136:1311–1317
49. Hatfield DL, Yoo Min-Hyuk, Carlson BA, Gladyshev VA (2009) *Biochim Biophys Acta* 1790:1541–1545
50. Barnes KM, Evenson JK, Raines AM, Sunde RA (2009) *J Nutr* 139:199–206
51. Sunde RA, Raines AM, Barnes KM, Evenson JK (2008) *Biosci Rep* 29:329–338
52. Wang J, Houk RS, Dreessen D, Wiederin DR (1999) *J Biol Inorg Chem* 4:546–553
53. Daun Ch, Lundh T, Onning G, Akesson B (2004) *J Anal At Spectrom* 19:129–134
54. Mounicou S, Mejia J, Caruso J (2004) *Analyst* 129:116–123
55. Palacios O, Ruiz Encinar J, Bertin G, Lobinski R (2005) *Anal Bioanal Chem* 383:516–522
56. Cabañero A, Madrid Y, Cámara C (2005) *J Anal Atom Spectrom* 20:847–855
57. Harrison I, Littlejohn D, Fell GS (1996) *Analyst* 121:189–194
58. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK (2007) *Antioxid Redox Signal* 9:775–806
59. Wang W, Chen Z, Davey DE, Naidu R (2009) *Microchim Acta* 165(1–2):167–172
60. Deng B, Shi A, Li L, Xie F, Lu H, Xu Q (2009) *Microchim Acta* 165(3–4):279–283
61. Jitaru P, Prete M, Cozzi G, Turetta C, Cairns W, Seraglia R, Traldi P, Cescon P, Barbante C (2008) *J Anal Atom Spectrom* 23:402–406
62. Jitaru P, Cozzi G, Gambaro A, Cescon P, Barbante C (2008) *Anal Bioanal Chem* 391:661
63. Hinojosa Reyes L, Marchante-Gayon JM, Garcia Alonso JJ, Sanz-Medel A (2003) *J Anal Atom Spectrom* 18:1210–1216
64. Jitaru P, Cozzi G, Seraglia R, Traldi P, Cescon P, Barbante C (2010) *Anal Methods* 2:1382–1387
65. Shigeta K, Sato K, Furuta N (2007) *J Anal Atom Spectrom* 22:911–916
66. Jitaru P, Roman M, Cozzi G, Fisticaro P, Cescon P, Barbante C (2009) *Microchim Acta* 166:319–327
67. Szpunar J (2005) *Analyst* 130:442–465
68. Kannamkumarath SS, Wrobel K, Wuilloud RG (2005) *Talanta* 66:153–159
69. Szpunar J (2000) *Analyst* 125:963–988
70. Kyriakopoulos A, Hoppe B, Alber D, Graebert A, Kuhbacher M, Weseloh G, Behne D (2004) *J Radioanal Nucl Chem* 259:453–458
71. Bruzelius K, Purup S, James P, Önning G, Akesson B (2008) *J Trace Elem Med Biol* 22:224–233.
72. Fan TWM, Pruszkowski E, Shuttleworth S (2002) *J Anal Atom Spectrom* 17:1621–1623
73. Chéry CC, Günther D, Cornelis R, Vanhaecke F, Moens L (2003) *Electrophoresis* 24:3305–3313
74. Pedrero Z, Madrid Y, Camara C, Schram E, Luten JB, Feldman I, Waentig L, Heiko H, Jakubowski N (2009) *J Anal At Spectrom* 24:775–784
75. Pedrero Z, Murillo S, Cámara C, Schram E, Luten JB, Feldmann I, Jakubowski N, Madrid Y (2011) *J Anal At Spectrom* 26:116
76. Hergenröder R, Samek O, Hommes V (2006) *Mass Spectrom Rev* 25:551–572
77. Claverie F, Pécheyran C, Mounicou S, Ballihaut G, Fernandez B, Alexis J, Lobinski R, Donard OFX (2009) *Spectrochim Acta Part B* 64:649–658
78. Ballihaut G, Claverie F, Cheyran CP, Mounicou S, Grimaud R, Lobinski R (2007) *Anal Chem* 79:6874–6880
79. Chassaing H, Chery CC, Bordin G, Vanhaecke F, Rodriguez AR (2004) *J Anal Atom Spectrom* 19:8517–8521
80. Ballihaut G, Tastet L, Pecheyran C, Bouyssiere B, Donard O, Grimaud R, Lobinski R (2005) *J Anal At Spectrom* 20:493–499
81. Tastet L, Schaumlöffel D, Bouyssiere B, Lobinski R (2006) *Anal Bioanal Chem* 385:948–953
82. Tasted C, Schaumlöffel D, Lobinski R (2008) *J Anal Atom Spectrom* 23(2008):309–317
83. Ruiz Encinar J, Ruzik R, Buchmann W, Tortajada J, Lobinski R, Szpunar J (2003) *Analyst* 128:220–224
84. Ruiz Encinar J, Ouerdane L, Buchmann W, Tortajada J, Lobinski R, Szpunar J (2003) *Anal Chem* 75:3765–3774
85. Ballihaut G, Pecheyran C, Mounicou S, Preud’Homme H, Grimaud R, Lobinski R (2007) *Trends Anal Chem* 26:184–190
86. Jacob C, Giles GI, Giles NM, Sies H (2003) *Angew Chem Int Ed Engl* 42:4742–4758
87. Ma S, Caprioli RM, Hill KE, Burk RF (2003) *J Am Soc Mass Spectrom* 14:593–600
88. Ip C, Zhu Z, Thompson HJ, Lisk D, Ganther HE (1999) *Anticancer Res* 19:2875–2880
89. Rooseboom M, Vermeulen NPE, Van Hemert N, Commandeur JNM (2001) *Chem Res Toxicol* 14:996–1005
90. Esaki N, Nakamura T, Tanaka H, Suzuki T, Morino Y, Soda K (1981) *Biochemistry* 20:4492–4496
91. Mihara H, Kurihara T, Watanabe T, Yoshimura T, Esaki N (2000) *J Biol Chem* 275:6195–6200
92. Palacios O, Lobinski R (2007) *Talanta* 71:1813–1816
93. Demovics M, Lobinski R (2008) *J Anal Atom Spectrom* 23:744–751
94. Bierla K, Demovics M, Vacchina V, Spuznar J, Bertin G, Lobinski R (2008) *Anal Bioanal Chem* 390:1789–1798
95. Lipiec E, Siara G, Bierla K, Ouerdane L, Spuznar J (2010) *Anal Bioanal Chem* 397:731–741
96. Ballihaut G, Mounicou S, Lobinski R (2007) *Anal Bioanal Chem* 388:585–591
97. Wang M, Feng WY, Zhao YL, Chai ZF (2010) *Mass Spectrom Rev* 29:326–348
98. Bettmer J (2010) *Anal Bioanal Chem* 397:3495–3502
99. Jitaru P, Goenaga-Infante H, Vaslin-Reimann S, Fisticaro P (2010) *Anal Chim Acta* 657:100–107
100. Xu M, Yang LM, Wang QQ (2008) *J Anal Atom Spectrom* 23:1545–1549
101. Rogers DA, Ray SJ, Hieftje GM (2010) *Metallomics* 2:271–279
102. Rogers DA, Ray SJ, Hieftje GM (2010) *Metallomics* 2:280–288

Capítulo IV. Desarrollo de metodologías enfocadas a la evaluación de los efectos asociados a la presencia de nanopartículas, y a la optimización de estrategias analíticas para su caracterización y cuantificación

El rápido crecimiento de la nanotecnología y su presencia en una amplia variedad de aplicaciones (electrónicas, biomédicas, medio ambientales, cosméticas, etc...) ha conllevado a la necesidad urgente de evaluar el impacto de estos materiales sobre la salud humana y el medio ambiente.

Hasta el momento, aunque son muchos los estudios enfocados a evaluar los efectos biológicos y tóxicos de las NPs en células y organismos vivos, en la mayoría de los casos los mecanismos implicados siguen sin estar elucidados.

En el primer trabajo presentado en este capítulo ("**Bioanalytical strategies to evaluate the toxicity of metallic nanoparticles**"). Trends in Analytical Chemistry, 43 (2013) 254) se presenta una discusión de las estrategias (bio)analíticas más utilizadas a la hora de llevar a cabo ensayos de citotoxicidad. Basándonos en los diferentes estudios aparecidos en la bibliografía, se ofrece una visión general de los diferentes métodos destinados a evaluar tanto la asimilación de las NPs por parte de las células, como su localización en los diferentes compartimentos celulares, además de los ensayos in vitro más determinantes a la hora de identificar las dianas involucradas en la interacción entre las NPs y las células.

El siguiente trabajo ("**Selenium nanoparticles inhibit in-vitro invasiveness and induce eIF3-mediated cell cycle arrest**"). ACS Nano (*Enviado*) se ha centrado en el estudio de las NPs de Se. Se conoce que algunos compuestos orgánicos de Se muestran un carácter quimiopreventivo frente a distintos tipos de cáncer como: próstata, pulmón, colon e hígado. La dosis de este elemento y su forma química son dos variables fundamentales a la hora de determinar sus propiedades anticancerígenas. En este sentido, y debido a las excelentes propiedades biológicas que presenta el Se en forma de NPs, se decidió evaluar los efectos biológicos de las NPs de Se en la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2. Entre los diferentes parámetros evaluados tras la exposición celular a las NPs de Se se encuentran: la medida de la viabilidad celular, localización de las NPs en el interior de las células, distribución de las distintas fases del ciclo celular y el comportamiento invasivo de las células. Para llevar a cabo cada uno de los ensayos mencionados, se recurrió a diversas técnicas analíticas y bioanalíticas como ICP-MS, TEM, microscopía de inmunofluorescencia, citometría de flujo, etc...

En este trabajo se aplicó por primera vez la estrategia de marcaje metabólico SILAC combinada con la espectrometría de masas con el fin de identificar las proteínas y mecanismos

relacionados con los efectos producidos por las NPs de Se en las células HepG2. El empleo de técnicas analíticas, de análisis celular y de la proteómica cuantitativa, permitió por un lado ampliar nuestro conocimientos sobre el efecto de las NPs de Se, y por otro lado validar los resultados obtenidos. Una compilación de todos los estudios desarrollados en este trabajo sugirió que las NPs de Se pueden considerarse como agentes quimiopreventivos en las terapias contra el cáncer.

La obtención de una correcta información sobre el tamaño, forma, área superficial, carga y reactividad de las NPs es clave para entender el comportamiento de éstas en el organismo y medio ambiente. Con este fin, muchos grupos de investigación están trabajando en el desarrollo de metodologías que permitan la caracterización de las NPs y proporcionen información cuantitativa. El último trabajo presentado en esta memoria (**“Prospects and Difficulties in TiO₂ Nanoparticles Analysis in Cosmetic and Food Products Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Hyphenated to an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”**). Analytical Chemistry (*Enviado*) está relacionado con este aspecto. El desarrollo de una metodología analítica basada en AF⁴-ICP-MS nos permitió caracterizar y cuantificar la presencia de NPs de TiO₂ en productos cosméticos (crema hidratante y maquillaje). Durante el desarrollo de esta metodología se optimizaron diferentes variables instrumentales y experimentales como: el flujo de separación “*cross flow*”, tiempo de inyección/focalización, composición de la disolución “*carrier*”, y la metodología de ultrasonidos utilizada para la dispersión de las NPs. La adición de SDS (0.2%), y metanol (6%) a la disolución “*carrier*” fue determinante a la hora de evitar interacciones no específicas entre las NPs y la membrana, además de otros problemas derivados de la baja recuperación de las NPs. La distribución de tamaños obtenida tras la calibración con patrones de tamaño conocido y la mostrada en las imágenes de microscopía electrónica ponen de manifiesto la incompatibilidad entre las NPs de TiO₂ y los métodos de calibración convencionales, siendo necesario la validación los resultados empleando otras técnicas analíticas como TEM. Este trabajo se ha centrado en la optimización de un método de calibración *on-line* AF⁴-ICP-MS para la cuantificación de las NPs de TiO₂. La energía de ultrasonidos focalizada, en comparación a los baños de ultrasonidos convencionales, resultó ser mucho más adecuada para conseguir una respuesta lineal entre la cantidad de NPs inyectadas y las señales registradas en ICP-MS (integradas como área de pico). Los resultados obtenidos tras la aplicación del método de calibración propuesto se validaron mediante diferentes metodologías (determinación del contenido de Ti total en las muestras mineralizadas por ICP-MS, y concentración de NPs de TiO₂ extraídas en medio acuoso por FIA-ICP-MS).

IV.1. Estrategías Bioanalíticas para Evaluar la Toxicidad de las Nanopartículas Metálicas

“Bioanalytical strategies to evaluate the toxicity of metallic nanoparticles”

Trends in Analytical Chemistry, 43 (2013) 254

Bioanalytical strategies for *in-vitro* and *in-vivo* evaluation of the toxicity induced by metallic nanoparticles

Jose L. Luque-Garcia, Raquel Sanchez-Díaz, Isabel Lopez-Heras, Pilar Martin, Carmen Camara

The increasing use of metallic nanoparticles (MNPs) in a wide variety of applications has led to an urgent need to evaluate the impact of these new materials on human health and the environment. To date, the potential toxicity of MNPs and their interaction mechanisms with cells and living organisms have not been fully addressed.

In this article, we discuss the different bioanalytical strategies that have been used for this purpose. We consider different methods aiming to evaluate cellular uptake and localization in cells and tissues, and *in-vitro* methods for the study of the toxicity induced by MNPs, considering different toxicity markers and high-throughput approaches for the identification of specific targets involved in the cell-MNP interaction. We also discuss special strategies related to the use of animal models to assess *in-vivo* toxicity of MNPs.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Animal model; Bioanalytical strategy; Cellular uptake; Interaction mechanism; *In-vitro* assay; *In-vivo* assay; Metallic nanoparticle (MNP); Target identification; Toxicity assessment; Toxicity marker

Jose L. Luque-Garcia*,
Raquel Sanchez-Díaz,
Isabel Lopez-Heras,
Carmen Camara

Department of Analytical
Chemistry, Faculty of
Chemistry, Complutense
University of Madrid,
Av. Complutense s/n, 28004
Madrid, Spain

Pilar Martin

Department of Vascular Biology
and Inflammation,
Fundacion Centro Nacional
de Investigaciones
Cardiovasculares Carlos III,
Madrid, Spain

1. Introduction

Nanoparticles (NPs) have received great attention for their use and applicability in many new consumer products. A recent estimate suggests that more than 1000 NP-containing consumer products are currently on the market. In addition, their ability to advance science with novel analytical and medical tools also makes them relevant to physical and life sciences [1].

NPs are generally defined as particles with at least one dimension of 1–100 nm. This smaller size gives them unique properties, especially because their specific surface area is larger and their reactivity is increased or different compared to bulk materials. These specific features are often linked with a potential toxicity [2]. Among the different kinds of NPs, metallic NPs (MNPs) are particularly used in many applications. The products and the applications of MNPs include electronics,

optics, textiles, medical applications, cosmetics, food packaging, water-treatment technology, fuel cells, catalysts, biosensors and agents for environmental remediation [3,4]. As a result of these applications, exposure of MNPs to the environment and humans is becoming increasingly widespread. Consequently, different metals in the form of MNPs have gained increasing access to tissues, cells and biological molecules within the human body [5]. Human exposure to MNPs is most likely to occur during manufacturing processes, but inhalation of MNPs released to the atmosphere, ingestion of water or food containing MNPs and dermal exposure from various sources (e.g., body lotions and sunscreens) are possible [6].

To date, the impact of exposure to MNPs on human health and the environment has not been fully assessed [7]. Research efforts to assess the toxic potential of MNPs have presented some serious, far-reaching challenges and there remains an urgent

*Corresponding author.
Tel.: +34 913 944 318;
Fax: +34 913 944 329;
E-mail: jlluque@quim.ucm.es

need for well-designed studies that will generate data so that the risk of MNPs can be assessed [8].

Chemical composition, shape, size, stability, surface coating, functionalization and purity of MNPs are essential aspects for not only applications but also potential toxicity [9]. Particle chemistry is especially relevant; depending on their chemistry, NPs can show different cellular uptake and ability to catalyze the production of reactive oxygen species, which is directly related to toxicity [10]. Many studies have also suggested the importance of shape and crystallographic phase when evaluating the toxicity induced by MNPs [3,11]. Uptake and cellular distribution of NPs are greatly influenced by their size. It has been demonstrated that cellular internalization is more pronounced for smaller NPs as compared to equivalent larger NPs at the same dose [12]. In addition, smaller MNPs show greater reactivity because of their larger surface area [2]. Aggregation of MNPs mainly depends on surface charge, material type and size. The formation of MNP aggregates affects the degree of cell internalization and thus modifies the potential toxic effect [13]. It is also crucial to consider surface modification of NPs by proteins or ions present in the culture media or when using metals, organic molecules or polymers as surface coatings [12–14]. These modifications can dramatically change the physicochemical properties of MNPs, including their magnetic, electric, and optical properties and their chemical reactivity [15].

In order to correlate any toxic reaction with MNP type, it is indispensable to investigate if the NPs are attached to the cell surface or if they enter cells. If NPs are found in cells, their localization in different compartments (e.g., endosomes, lysosomes, mitochondria, nucleus or cytosol) may also provide some answers regarding their potential toxicity [16]. It is also very important for understanding the complex processes that govern cellular uptake and intracellular fate of MNPs [17]. Finally, *in-vivo* studies are also needed to design specific, safe clinical trials to develop new strategies for applications of MNPs and also to evaluate their risk to the environment [18].

In this review, we present different analytical and bioanalytical strategies to study the interaction of MNPs with cells and living organisms in order to assess their potential toxicity. We start by discussing different options to evaluate cellular uptake and localization of MNPs by using atomic techniques and imaging approaches. We also review *in-vitro* assays to study the interaction of cells with MNPs considering those that aim to evaluate specific cellular pathways or cellular responses to MNP exposure and those based on high-throughput discovery platforms focused on identifying particular targets (genes and/or proteins) involved in the cell-MNP interaction. Finally, we review considerations about *in-vivo* assays depending on the different animal models that have been used to date.

2. Cellular uptake and localization of MNPs

When studying the interaction of MNPs with living organisms and cells, one of the key aspects is the evaluation of the cellular uptake and the localization of the MNPs within the cells and tissues. The quantification of MNPs and ions released from them is mainly carried out by sensitive analytical techniques [e.g., inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS)] while localization, which requires spatial resolution analysis, is generally performed by different microscopic techniques.

2.1. Quantification of NPs and ions released from NPs using spectrometric techniques

ICP sources are regarded as excellent tools for elemental analysis. Many authors have used techniques based on ICP in order to provide a quantitative analysis of the uptake of MNPs in different organisms [19]. ICP-MS provides high sensitivity and robustness for quantifying metal composition in a large variety of samples. Christen and Fent used an ICP-MS equipped with an octopole reaction system to minimize possible interferences, and confirmed that the cytotoxicity induced by Ag-doped SiO₂ NPs was caused by Ag ions released from the NPs [7].

Other detectors have also been coupled to an ICP source for this purpose. The use of ICP with optical emission spectroscopy detection (ICP-OES) has been employed to perform cadmium analysis as an indication of the concentration of CdSe/ZnS quantum-dot (QD) NPs in plasma and organs of *Daphnia magna* after 48 h of exposure [20]. The impact of three metal-oxide NPs (nonporous SiO₂, mesoporous SiO₂ and anatase TiO₂ NPs) on the immune response of mast cells was evaluated using ICP-OES, showing that the cell-NP interaction depended on the chemically-modified surface of the NPs [21].

However, the direct analysis of MNPs using ICP as ionization source presents some drawbacks due to the limited availability of commercial standards for MNPs and the low nebulization efficiency. This technique is able to ionize and to atomize spherical NPs of 5–25 nm in aqueous and organic solutions [22]. However, MNP aggregates might not be effectively ionized in the plasma, and that can result in lower recoveries. In these cases of low ionization efficiency, electro-thermal vaporization (ETV) should be considered as an alternative sample-introduction system because it allows pre-digestion of the MNPs [23,24].

Another problem that has to be considered is the potential adsorption of the MNPs on the sample-introduction system, which can complicate the quantification of MNPs in real samples [25]. Thus, it is important to carry out a previous digestion, using a combination of acids and high temperature [26], to determine the total metal concentration of the tested element. In this way, the

concentration of Cd and Se were determined in *Arabidopsis thaliana* plants exposed to CdSe/ZnS QDs. Leaves and roots were thoroughly rinsed with Milli-Q water to remove material that was not adsorbed or integrated by the plant. The tissues were digested in concentrated nitric acid and 30% hydrogen peroxide (4:1) for 2 h using a hot plate [27]. Conventional digestion procedures can be very time consuming so the use of microwaves can minimize the time required for sample treatment. In addition, a closed microwave-digestion vessel might lower the risk of analyte losses compared to open digestion. The accumulation of TiO₂ NPs was observed in lung tissue of Wistar rats after analysis of the levels of Ti by digesting the sample with nitric acid and hydrogen peroxide prior to double-focusing (DF)-ICP-MS detection [28]. Differences between the bioaccumulation of Ag NPs and Ag microparticles in rat brain microvessel vascular endothelial cells (BMVECs) were evaluated by acid digestion with nitric acid prior to the analysis with ICP-MS. This study demonstrated that Ag NPs accumulate in cells more easily than microparticles [29].

Analytical methods based on acid digestion offer the possibility to reduce the matrix effects due to eliminating biological components present in the sample or stabilizing agents employed to avoid NP aggregation. However, this procedure makes it impossible to distinguish between metal species (MNPs taken up by the organism and other metal species). An alternative to digestion of solid samples is the use of ultrasound. The use of ultrasound-assisted extraction is a very promising methodology for metal species and MNPs. In addition, ultrasonic energy breaks up MNP aggregates [30]. However, as in digestion procedures, the chemical form of MNPs might alter due to the use of basic or acid solutions in the extractant. Using this approach, total Ti concentration was determined in fibroblasts exposed to TiO₂ NPs after sonication of trypsinized cells in an ultrasonic bath for 30 min [11].

Other techniques include furnace atomic absorption spectrometry (FAAS), used to determine the total Ag content in harvested THP-1 cells prior to acid digestion in 69% HNO₃ [31], or graphite furnace AAS (GF-AAS) [13], which are alternatives to ICP-based techniques.

Despite the numerous advantages offered by ICP-MS and other atomic techniques, it is important to emphasize that this technique by itself is unable to differentiate between metal species (e.g., MNPs or ions). Such differentiation requires previous treatments (e.g., filtration, centrifugation and sedimentation) that allow isolation of MNPs from solutions, or otherwise, the use of a separation technique coupled to the ICP-MS. Separation techniques [e.g., liquid chromatography (LC) or field-flow fractionation (FFF)] coupled to ICP-MS are among the most promising approaches. In this way, size-exclusion chromatography (SEC) columns and hydrodynamic chromatography (HDC) have been described in the

literature as alternatives to separate MNPs of 10–80 nm [32,33].

Currently, FFF is a promising method for size separation of natural and engineered NPs, providing a wide dynamic range. Although an ultraviolet (UV) detector is the most common system used in combination with FFF, elemental information can be obtained by combining FFF with ICP-MS. One of the main advantages of FFF-ICP-MS is not only the possibility for multiple elemental detection, but also the higher sensitivity achieved (in the ng/L range) compared to UV detection. To provide complementary information, the FFF can also be coupled to a multi-angle light scattering (MAL) for particle-size characterization. The two FFF principles mainly used are sedimentation FFF (SedFFF) and the asymmetric flow FFF (AF4). SedFFF-ICP-OES has been employed to study size-based elemental distribution of air particles and MNPs (e.g., Al, Ti and Fe) [34].

In recent investigations about the toxicity of TiO₂ present in sunscreen products and the influence of polymer-coated CdSe/ZnS QDs to *Daphnia magna*, on-line FFF-ICP-MS was applied to characterize the particle size and the composition of MNPs [20,35]. In spite of the promising results obtained so far, there are still some aspects that require further investigation (e.g., problems related to membrane-particle interaction, the different behavior of MNPs according to their chemical structure, and the influence of eluents during the separation step, which can lead to erroneous size information and negatively affect recovery rates).

2.2. Determining the stability of MNPs

The aggregation state of MNPs is a crucial factor for experimentally assessing their toxic activity. In *in-vitro* studies, the influence of biological components present in the culture media on MNPs has been evaluated on many occasions (e.g., serum proteins, antibiotics, vitamins, and electrolytes may interact with MNPs to change their physicochemical properties and aggregation state. While serum proteins may adsorb onto the surfaces of MNPs, changing their size and surface chemistry, the presence of electrolytes and the high ionic strength of the culture media may alter their aggregation state).

Due to the dimensions of MNPs, detection and characterization of MNPs is generally performed by microscopic techniques. Scanning electron microscopy (SEM), transmission EM (TEM) and atomic force microscopy (AFM) are the most commonly used techniques to visualize MNPs and their features, including aggregation state, dispersion, sorption and particle size.

Before evaluating the toxicity of Ag NPs in different cell lines, Mukherjee et al. used TEM and SEM to determine the stability of Ag NPs and their possible interaction with the culture media [5]. The aggregation state of Ag NPs was also studied by Oukarroum et al., whose TEM images showed an increase in the diameter of the

NPs in all the culture media tested for growing two types of green algae [36]. Although TEM images provide useful information about the morphology and the aggregation state of MNPs, these images might not completely represent the morphology of the MNPs under the real experimental conditions because TEM images are acquired on dried samples.

As an alternative, dynamic light scattering (DLS) can be combined with TEM, thus allowing the analysis of the MNPs in solution. The characterization of stable mono-disperse and aggregated Si NPs by TEM and DLS was carried out to study the effect of these MNPs on macrophages and fibroblasts. The DLS results demonstrated that the mean hydrodynamic diameter of particles increased from 25 nm to 183 nm [2]. The analysis of Au NPs, synthesized in citrate media as reducing agent, by DLS revealed that the surfaces of the NPs were covered by citrate. As mentioned above, proteins and other biological molecules may bind to the surface of the MNPs. The absorption spectra of Au NPs in solution showed that not only were the Au NPs covered by citrate, but also proteins or lipids were adsorbed onto their surface [37].

2.3. Localization of MNPs into cells and living organisms using microscopic techniques

TEM is also considered an appropriate technique to discriminate between MNPs localized inside cells and tissues from those that are only externally attached. Obtaining reliable information about the intracellular localization of MNPs is important to establish NP-cell interactions. It is known that smaller NPs can enter more easily into cells than larger ones [38], which might explain the higher toxicity of smaller MNPs.

When it comes to design a protocol for TEM, it is very important to select the most suitable fixing agent. The most common fixings are aldehydes (glutaraldehyde and formaldehyde) and osmium tetroxide. Aldehydes react with amines and amino acids (lysine and arginine), generating cross-linked proteins, which preserve cellular structure. However, these fixing agents do not react with most lipids of the cellular membrane, leading to problems during fixing and processing. For this reason, osmium tetroxide is generally used as a secondary fixing, since it is able to react with unsaturated lipids and some proteins, thus stabilizing the membrane structures and also adding electron density to enhance the contrast.

Another important aspect is the choice of buffer, in which the fixing will be dissolved. It should maintain the cell in its physiological state, when possible. The most frequently used buffer is phosphate buffer saline (PBS). Buffers containing amine groups (e.g. Tris) should not be used because these groups might react with the fixing molecule. Typically, samples prepared for TEM analysis have to be dehydrated and embedded

in resin (overnight with temperature) to allow ultra-thin sections to be cut. Allouni et al. developed a protocol in which cells were fixed in 1.5% glutaraldehyde and 0.1 M Na-cacodylate buffer (pH 7.4), and post-fixed in 1% osmium tetroxide. TEM images revealed that not only were TiO₂ NPs attached to the surface of the cells, but also they were in vesicles and distributed in the cytoplasm [11].

A mixture of glutaraldehyde and formaldehyde is also very commonly used as fixing agent. A fixing solution containing 3% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde was employed to visualize both the localization of SiO₂ NPs and Ag-doped SiO₂ NPs in fibroblast-like fat-head minnow cells [17], and Au NPs in human lung carcinoma cells A549 [37].

In some cases, the resulting blocks embedded in resin are incubated in uranyl-acetate (1%-6%) to obtain a higher electron density and image contrast, which is especially useful for smaller particulate specimens. However, this stain is not recommended in the treatment of specimens that are unstable in acid conditions, due to the low pH of the solution [7,11].

Ultrahigh-resolution imaging (URI) is a promising technique for studying cell-NP interactions, as it allows direct visualization of both cells and MNPs without the need of an elaborate sample preparation and without the use of fluorescent tags. In URI, the illuminator is connected to the light source by a liquid light guide, which allows transport of light without loss of intensity, and minimizes the thermal impact on living systems. In a recent study, the cellular uptake of TiO₂ NPs by fibroblasts was investigated by combining SEM and TEM with URI. For URI analysis, cells were washed, fixed in 4% formaldehyde for 15 min at room temperature and, finally, a drop of mounting media was added to the slides and encased with a cover-slip. URI images showed that TiO₂ NPs appeared to be both taken up by and attached to the cells, mainly as agglomerates. The discrimination between MNPs attached to the cell from those internalized was performed by changing the focus plane in the URI microscope. As shown in Fig. 1, the agglomerates could be easily distinguished from other cellular components due to their brightness [11].

Dark-field microscopy (DFM) is able to provide a panoramic view of non-fluorescent NPs in cells since NPs appear as a bright image superimposed on a dark background. Because DF illumination has a very low background, low signals are sufficient to detect individual non-fluorescent NPs. Although there are limited studies on accumulation of non-fluorescent NPs at the single-cell level using DFM, this technique has been used in studies focused on Au NPs. As in URI, sample preparation is very straightforward when using DF imaging. The accumulation of Au NPs in cells has been observed in a time-course experiment. Cells were seeded on coverslips in 24-well plate, fixed in 4% paraformaldehyde for

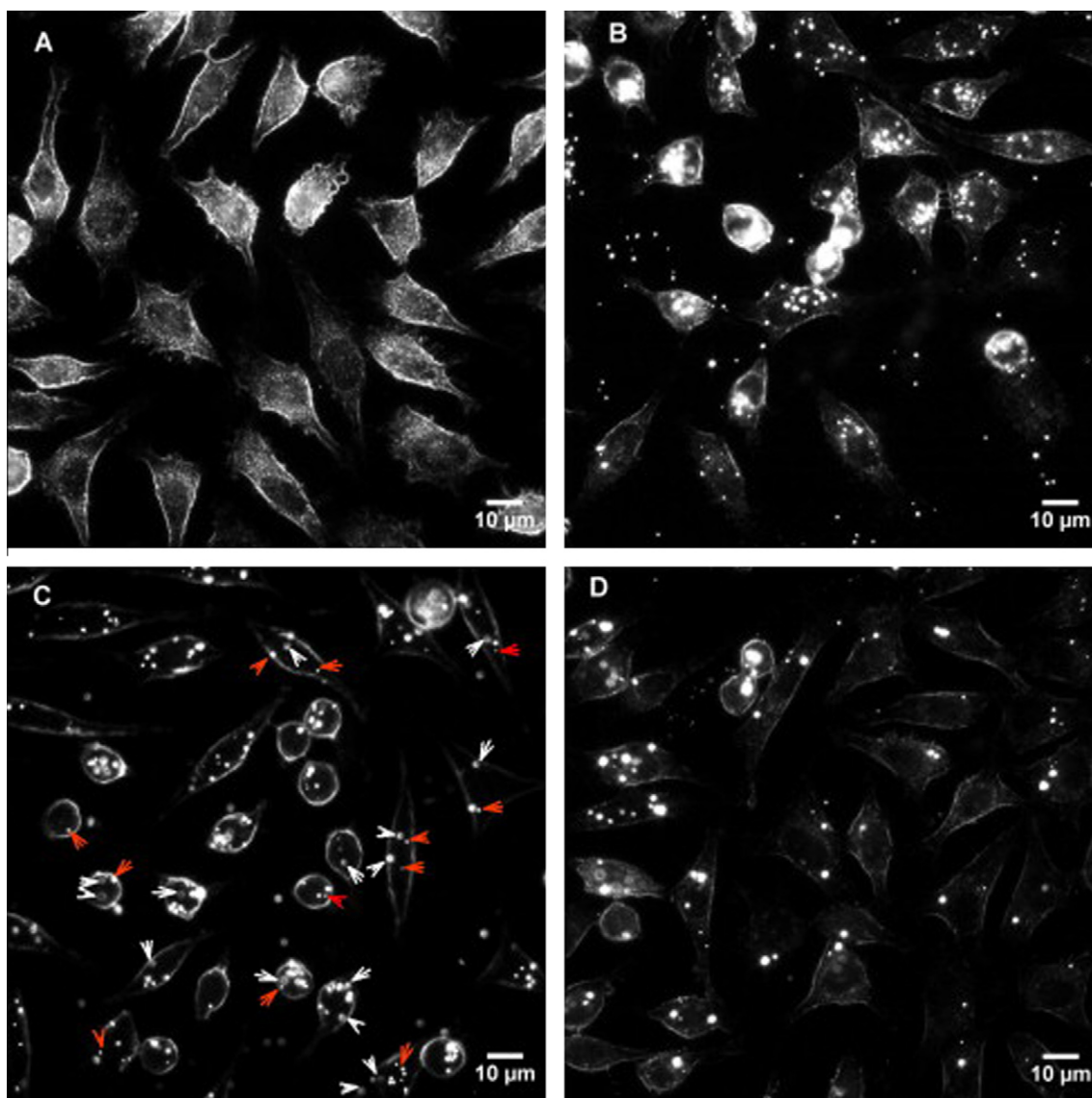


Figure 1. URI images of L929 fibroblasts at 100x magnification after 24-h exposure to 0.5 mg/L of TiO₂ NPs. Bright spots are NPs internalized or attached to the membrane. (A) Control cells. (B) Rutile, 40 nm. (C) Rutile and anatase mixture, <100 nm. (D) Anatase, 10 nm. White arrows (C) show agglomerates that appear to be attached to the cell membrane; red arrows point at agglomerates inside the cells (Reproduced with permission of Elsevier).

10 min after MNP exposure [26], and Au NPs embedded inside the cell were identified in their aggregated states [17].

Another option for visualizing MNPs is based on functionalization with fluorescent markers, which allows use of fluorescence microscopy. However, it is important to keep in mind that the attachment of a fluorochrome may alter the physicochemical properties of MNPs. MNPs can be easily functionalized by using specific fluorochromes, which have their own absorption and emission spectra [e.g., fluorescein isothiocyanate (FITC), ALEXA 488, BODIPY-FL, propidium iodide (PI), Mito-Tracker Red and rhodamine are among the fluorochromes commonly used in many bioapplications]. FITC

presents maxima absorption in the blue-light range of the visible light spectrum (approximately at 488 nm). When FITC is irradiated at 488 nm, it fluoresces at 520 nm, emitting a greenish-yellow glow. Other fluorochromes (e.g., propidium iodide, ALEXA 488 and BODIPY-FL) have excitation and emission profiles similar to FITC. By contrast, rhodamine 123 and Mito-Tracker Red fluorochrome are excited by light in the green range and emit at red wavelengths.

Kurepa and co-workers synthesized Alizarin red S (ARS)-TiO₂ NP conjugates to study the uptake and the distribution of NPs in plants. The covalent surface modification of the MNPs was performed following a straightforward protocol in which the MNPs were mixed

with an ARS solution. The high surface reactivity of synthesized TiO₂ NPs (smaller than 20 nm) was very adequate in the formation of ARS-NP conjugates [38].

3. *In-vitro* cytotoxicity assays

Cytotoxicity assays are based on the idea that toxic agents affect basic functions of cells, and thus their toxicity can be evaluated by measuring cellular damage. It is known that the toxic effects of MNPs on a cell culture may differ, depending on the incubation time and the concentration of MNPs used. Many cytotoxic effects are due to the number of MNPs internalized in the cells rather than the total concentration of MNPs added to the cell-culture media. Generally, the amount of MNPs taken up by cells differs by several orders of magnitude from the amount of MNPs used in the cellular treatment [39]. The uptake efficiency depends on not only MNP concentration but also other properties of MNPs (e.g., size and shape). Exposure times and concentrations greatly vary from one study to another. Concentrations of the order of µg/L or a few mg/L are commonly used, while exposure times of 24–96 h are usually selected [6,9,40], although internalization of MNPs has been observed at shorter exposure times under certain conditions [15,41].

When performing a cytotoxicity assay, cell types are generally chosen by considering the organ in which the studied MNPs are accumulated in organisms. In this way, hepatic cells [42,43] and macrophages [2] are most commonly used, since MNPs tend to accumulate in liver and spleen. Other cell types (e.g., fibroblasts, which are the major cellular constituent of fibrous connective tissue) have also been used (e.g., to assess the effects of TiO₂ NPs released from implant materials) [11].

It is important to keep in mind that the toxic effects induced by MNPs may depend on the cell line tested and these effects may not necessarily be the same when exposing other cell lines to the same MNPs [5,44]. In this way, Patra et al. found that citrate-capped Au NPs induced toxicity in human carcinoma lung cells greater than in liver carcinoma cells at the same dosage [45]. The effects could even be the opposite, as shown by Chen et al., who found that SeNPs inhibit cellular growth in hepatocarcinoma cells but increase cell proliferation when using human fibroblasts [44].

Below, we describe several common assays that have been applied when evaluating the effect of MNPs in different cell lines, most of them involving the use of vital dyes, protease markers, and colorimetric, fluorescence, or luminescence detection.

3.1. *Assessment of membrane integrity*

The cell membrane is a thin, semi-permeable membrane that surrounds the cytoplasm of a cell and constitutes a functional barrier. Its function is to protect the integrity

of the cell by controlling the traffic into and out of the cell, which is regulated by transporters, receptors and secretion pathways. Since cytotoxic compounds often compromise the cell membrane, assessing cell-membrane integrity is one of the most common ways to measure cell viability and cytotoxic effects. For this purpose, the so-called vital dyes (e.g., trypan blue and propidium iodide) are generally used. These compounds can freely cross the cell membrane when it has been compromised and stain intracellular components, but are excluded from the inside healthy cells [46]. Alternatively, membrane integrity can be evaluated by monitoring the presence in the culture media of substances that are normally sequestered inside healthy cells [5]. One commonly measured is lactate dehydrogenase (LDH) [47]. LDH leakage from damaged cells can be measured with a coupled enzymatic assay resulting in the conversion of a tetrazolium salt into a red formazan product. The intensity of the color produced is proportional to the number of cells with compromised plasma membranes [37]. There are several commercially available kits to carry out this assay, which does not involve any kind of sample preparation, since the substrate mixture is directly added to the culture media and the resulting reaction product (red formazan) is measured spectrophotometrically. Using this assay, Hussain et al. showed that LDH leakage for MoO₃, Al, Fe₃O₄, MnO₂, and W NPs did not produce cytotoxicity up to a concentration of 100 µg/mL in rat-liver cells, while Ag NPs were highly toxic at those concentrations in the same cells [10]. In the same manner, Gerloff et al. showed that only anatase-rutile-containing NPs, in contrast to the pure, fine TiO₂, induced cytotoxicity in human intestinal cells [3].

3.2. *Measurement of cellular metabolic activity*

An early indication of cellular damage is a reduction in metabolic activity. Thus, assays able to measure metabolic functions (e.g., ATP levels or mitochondrial activity) have been widely used to evaluate the toxicity of MNPs. One of the most widely-used methods is the 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay [14,48], which measures the reducing potential of a cell. It is based on the capacity of healthy cells to reduce MTT to formazan by mitochondrial reductases. Formazan is a colored compound, whose absorbance can be measured spectrophotometrically at a wavelength of 500–600 nm. In this approach, cells are incubated with MTT (2–10 mg/L) for 4–5 h and then the formazan crystals are commonly dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (or other organic solvent) prior to colorimetric detection. It is important to consider the signal provided by the phenol red usually present in culture media. Thus, it is recommended to either use red-phenol-free media or to remove the media before dissolving the formazan

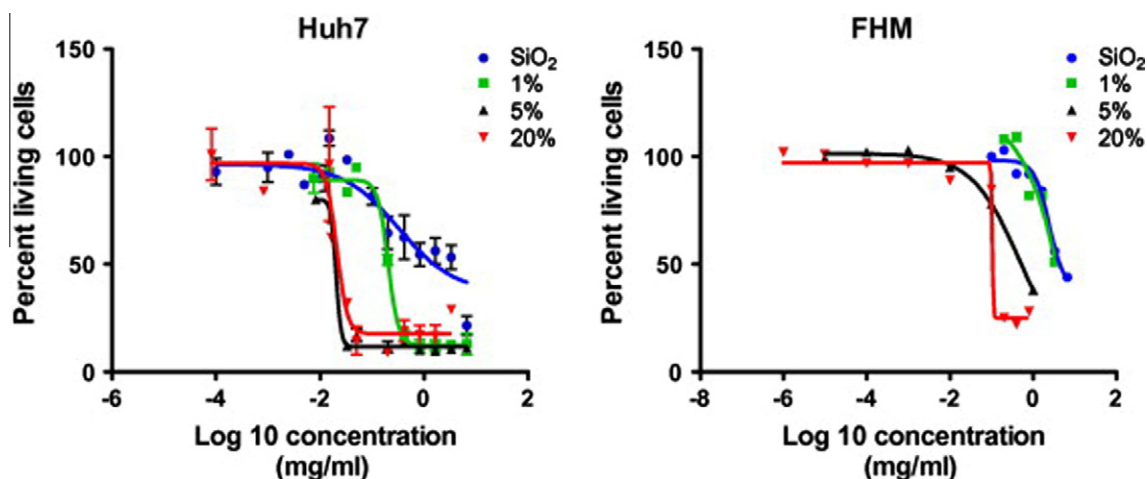


Figure 2. Cytotoxicity of NPs. Huh7 (left) and FHM (right) cells were treated for 24 h with different concentrations of SiO₂ NPs (blue dots); SiO₂ 1% Ag NPs (green squares), SiO₂-5% Ag NPs (black triangle); and SiO₂-20% Ag NPs (red triangle) followed by assessing cell viability by MTT assay. Shown are the results of three independent experiments (Reproduced with permission of Elsevier).

crystals. The cytotoxicity of several MNPs has been evaluated by comparing the absorbance of formazan in control *versus* cells exposed to MNPs. Christen and Fent showed that human hepatic cells (Huh7) reacted more sensitively to SiO₂ NPs than fibroblast-like fish cells (FHM). Exposure of the two cell lines with SiO₂-Ag NPs, containing 1%, 5% and 20% of Ag demonstrated again that Huh7 cells were more sensitive than FHM cells (Fig. 2) [7]. Yuan et al. used the MTT assay to show how the viability of lung fibroblast exposed to ZnO decreased in a dose-dependent manner independently of the particle size [49]. Other close dyes [e.g., 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS), 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) and water soluble tetrazolium salts (WSTs)] have also been used for the same purpose [3,6].

3.3. Evaluation of the oxidative stress

Oxidative stress is an imbalance of pro-oxidants and antioxidants. It is associated with increased production of oxidizing species or a significant decrease in the effectiveness of antioxidant defenses. One common way to analyze oxidative stress in cells is by measuring glutathione (GSH) levels. GSH is the major intracellular low-molecular-weight thiol that plays a critical role in cellular defense against oxidative stress. There are many commercially-available GSH-detection kits, mainly based on colorimetric and fluorimetric detection. One key step in this approach is the thorough wash of the cells with PBS to remove the excess of dye prior detection. GSH measurement is widely used in toxicological studies [50] and it has also been used to evaluate the toxicity of different MNPs. For example, GSH depletion has been

observed in cells exposed to Ag NPs, although the degree of depletion greatly depended on the cell line tested [5].

When cells are exposed to environmental stress they can generate reactive oxygen species (ROS), both radical ROS (nitric acid and hydroxide radicals) and non-radical ROS (hydrogen peroxide). When the increase of ROS is too high and it overwhelms the antioxidant defense, cells are prone to suffer cell damage and even apoptosis. Several studies have linked the increase of the ROS level in cells with exposure to MNPs, so allowing use of the ROS level as a cytotoxicity marker. The most widely used method to measure the intracellular production of ROS is the dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay [8]. DCFH-DA penetrates the cells, where it is hydrolyzed by unspecific esterases and converted into a stable green fluorescent product, 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), in the presence of oxidative species [53]. DCFH-DA is prepared in phenol red-free media and used at a final concentration of 10 μM. Cells are incubated with this reagent for 15–30 min and then washed twice with PBS prior to fluorimetric detection. It is important to carry out this assay in the dark to avoid the fluorophore fading. Using this approach, Konczol et al. demonstrated that the ROS production observed in alveolar epithelial cells increased after 24 h of incubation with Fe₃O₄ NPs in a concentration-dependent manner. This study also showed that the particle size did not affect the cytotoxicity of these MNPs [51].

Reaction of generated ROS with other fluorescent probes [e.g., dihydroethidium (DHE)] has also been used [52]. In addition, when ROS production increases, other intracellular events (e.g., lipid peroxidation) are initiated, so, by measuring these events, it is possible to evaluate the oxidative damage of cells exposed to MNPs. Malondialdehyde (MDA) formed from the breakdown of

polyunsaturated fatty acids, can be used as a convenient index for determining the extent of lipid peroxidation reactions. MDA formation can be measured by Western Blot [53], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or the traditional thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay based on the reaction of MDA with thiobarbituric acid reactive substances to yield a fluorescent product [41]. After cell lysis, the cell extract is mixed with the reaction solution and incubated at 90°C for 1 h. The product formed is extracted with an organic solvent (e.g., butanol) and the fluorescence is measured in the organic phase. Addition of cadmium chloride to control cells can be used as positive control since it induces lipid peroxidation [52]. Passagne et al. used this assay to show how SiO₂ NPs affected the production of MDA, depending on the cell line tested and the particle size. While smaller NPs (20 nm) induced the formation of MDA in porcine tubular cells more than bigger NPs (100 nm), the effect of both NPs was not significantly different when using human kidney cells [52].

3.4. Measuring apoptosis induced by MNPs

As commented upon above, exposure of cells to MNPs can increase ROS production and lipid peroxidation, which ultimately can cause apoptosis. There are several strategies to evaluate the degree of apoptosis based on the measurement of different parameters. There are several protein markers of apoptosis, including Bax, Bcl2, p53 and caspases, which can be easily monitored using Western Blot with the appropriate antibodies [8,55], colorimetric assays [56] or real-time polymerase chain reaction (PCR) [38,58]. Apoptosis can also be visualized by studying nuclear morphology, particularly chromosome condensation, assessed using nuclear-specific dyes [e.g., 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and Hoechst] and fluorescence microscopy [54,55].

However, the technique generally chosen to evaluate apoptosis is flow cytometry. The most important factor that has to be considered when preparing samples for flow cytometry is the density of the cell suspension, which should be kept between 10⁵–10⁷ cells/mL to prevent clogging the narrow bores of the cytometer and its tubing.

Two common methods to evaluate apoptosis by flow cytometry are the measurement of the mitochondrial membrane potential and the annexin-V assay. Since mitochondria act as a point of integration for apoptotic signals originating from both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways [57], loss of mitochondrial membrane potential can be associated with the activation of caspases and the initiation of apoptotic cascades [58]. To measure the percentage of cells with depolarized mitochondria, resuspended cells are incubated at 37°C for 10–15 min with a solution of 10 µg/mL JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide). After incubation, cells are immediately centri-

fuged to remove the supernatant and the cell pellet is resuspended in PBS and then analyzed by flow cytometry. The membrane-permeant JC-1 dye exhibits potential-dependent accumulation in mitochondria, indicated by a fluorescence emission shift from green (~529 nm) to red (~590 nm). Consequently, mitochondrial depolarization is indicated by a decrease in the red/green fluorescence-intensity ratio. The potential-sensitive color shift is due to concentration-dependent formation of red fluorescent J-aggregates [54]. Using this method, Chen et al. demonstrated that Se NPs induced apoptosis in melanoma cells through mitochondrial-mediated pathways. In this study, the percentage of cells with depolarized mitochondria increased from 5.6% (control) to 9.3% when exposing the cells to 20 µM Se NPs, and up to 30.0% when using 40 µM Se NPs [56].

In apoptotic cells, phosphatidyl serine (PS) is translocated from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane, so PS becomes exposed to the external cellular environment. Annexin-V labeled with a fluorophore (e.g., FITC) can selectively identify apoptotic cells by binding to the exposed PS on the outer leaflet of the membrane. The number of labeled cells can then be quantified by flow cytometry. Annexin-V-FITC is usually used together with PI to differentiate between apoptotic and dead cells. Cells are resuspended (10⁶ cells/mL) in binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.5 containing 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂) and then incubated in the dark with annexin-V-FITC and PI for 10 min at room temperature [54]. Generally, fluorescence emitted by annexin-V-FITC and DNA-bound PI in each event is detected as green and red fluorescence, respectively.

Other fluorophores can also be conjugated to annexin-V [44]. This assay is generally used to confirm that the cell death observed after exposure to certain MNPs is generally caused by apoptosis [44,59]. It is important to mention that certain fluorochromes may be adsorbed on the surface of MNPs, which may cause fluorescence of the NPs, and quenching or enhancement of the fluorescence of fluorochromes, thus altering the results of the flow-cytometry assay. In addition, cellular internalization or deposition of MNPs may avoid the correct binding of the fluorochromes to their target molecules. As an example, the annexin-V assay may give false negatives as a result of NP deposition on the cellular membrane, which hinders the annexin-V from binding to PS.

3.5. Genotoxicity assessment

The potential DNA-damaging properties of MNPs have also been assessed in many cases using the Comet assay and the formamidopyrimidine glycosylase (Fpg)-modified Comet assay [3,51,54]. The Comet assay (also known as single-cell gel electrophoresis) is a rapid, sensitive, simple method for detecting DNA damage at the level of individual cells [60]. It involves encapsulation of single cells in low melting-point agarose. Then, cells are lysed to

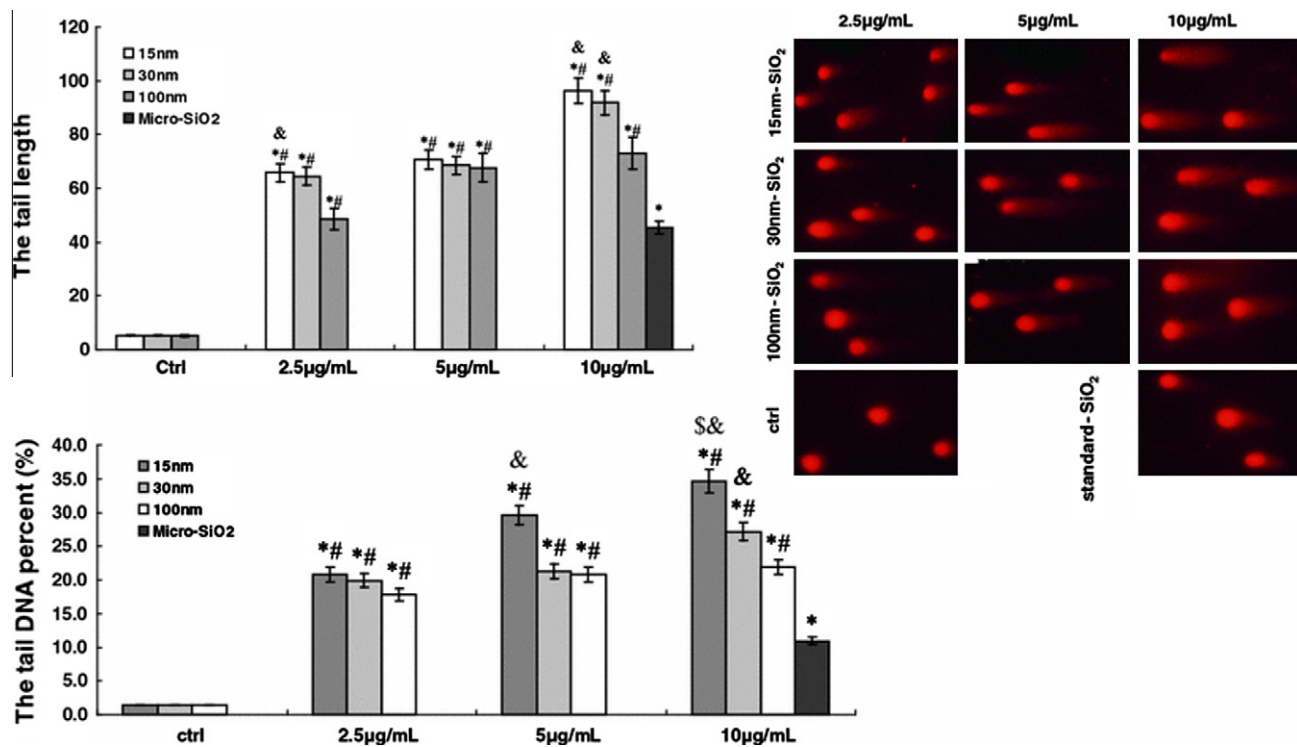


Figure 3. The effects of exposure to 15-nm, 30-nm, 100-nm or μm -sized SiO_2 particles on DNA damage in HaCaT (human keratinocytes) cells. Representative images and quantitative analysis of tail length or tail DNA percentage of comet in HaCaT cells. Values shown were the mean from 300 randomly selected comet images of each sample (Reproduced with permission of Springer).

form nucleoids containing supercoiled loops of DNA. Electrophoresis at high pH results in DNA structures resembling comets. It is important to reduce the pH after electrophoresis to avoid the contribution of alkali-labile sites, since they strongly decrease the sensitivity of the Comet assay. The extent of DNA migration depends directly on the DNA damage present in the cells. It should be noted that DNA lesions consisting of strand breaks after treatment with alkali, alone or in combination with certain enzymes (endonucleases), increase DNA migration, whereas DNA-DNA and DNA-protein cross-links retard DNA migration. This is followed by visual analysis with staining of DNA with ethidium bromide [54,61]. Other dyes (e.g., PI, Hoechst or DAPI) have also been used. The intensity of the comet tail relative to the head reflects the number of DNA breaks. Gong et al. used this assay to evaluate the effect of SiO₂ NPs of different particle size in human keratinocytes, showing a significant increase in the comet-tail length of cells exposed to smaller SiO₂ NPs (15 nm), which means an increased DNA damage in an NP-size-dependent manner (Fig. 3) [62].

Several studies used a modification of the Comet assay specifically to evaluate oxidative DNA damage. For this purpose, the endonuclease formamide pyrimidine glycosylase (Fpg) is generally used for detection of 8-OH guanine, other damaged purines, basic sites (AP sites) and ring-opened N-7 guanine adducts [63]. This endonuclease is added to the gel and incubated for 30 min at 37°C in a humidified chamber. It is important to prepare this enzyme in a buffer solution containing b-mercaptoethanol to preserve the enzyme and to take into consideration that the inclusion of sulfhydryl reagents in the reaction buffer would significantly increase background-DNA breakage. Gerloff et al. demonstrated that only anatase/rutile TiO₂ NPs significantly increased DNA-strand breakage while none of the anatase TiO₂ NPs induced oxidative DNA damage [3].

3.6. Use of microscopy to study cellular morphological alterations

Several studies derived from EM analyses have reported morphological alterations in the cell layer and/or cell shape after exposure to cytotoxic agents, so it is not surprising that the visualization of morphological alterations is considered a primary index of toxicity. Changes in the morphology of lung fibroblasts were examined by SEM after incubation with 20-nm ZnO NPs for 72 h. For this analysis, cells were washed with PBS and dehydrated in 35% alcohol for 10 min, followed by consecutive addition of ethanol solutions from 40% to 100%. Finally, the samples were dried in vacuum before SEM analysis. A very rough cell surface was observed in ZnO NP-treated cells, compared with control cells, which have a regular morphology and smooth surface. Moreover, the presence of nanosized pores of 20 nm in the

plasma membrane indicated that ZnO NPs could have entered into the cells, thus affecting the inner structure and inducing apoptosis and/or necrosis [49].

Unlike SEM or TEM techniques, phase-contrast microscopy allows examination of living cells in their natural state without need for previous fixation or dehydration steps. Hussain et al. observed that increasing the concentration of Ag NPs in culture media led to morphological changes in rat-liver cells, which started to shrink, and became irregular in shape [10]. In the same way, the cellular morphology of epithelial carcinoma cells was observed in order to evaluate the cytotoxicity of Fe₃O₄ NPs with different surface functionalizations [14].

For a more exhaustive visualization of the morphological changes, cells may be fixed and differentiated using the hematoxylin-eosin method. Hematoxylin (blue-purple dye) stains nucleic acid and eosin (pink dye) stains proteins non-specifically. The required protocol for sample preparation is very straightforward. In a study of cytotoxicity of Fe NPs, HeLa cells were seeded on the glass coverslips in 24-well plate and incubated for 2 h with the NPs. Then, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with hematoxylin and eosin. In this case, no significant changes in cellular morphology were observed after exposure to Fe NPs [30], which could be due to the extremely short exposure time selected to carry out the study.

3.7. High-throughput discovery platforms

In addition to the assays commented before, which are mainly based on target-directed approaches, high-throughput discovery platforms based on gene- and protein-expression profiling can provide very useful information on the specific mechanisms of interaction of MNPs with cells. Gene expression is the term used to describe the transcription of the information contained within the DNA into messenger RNA (mRNA) molecules that are then translated into proteins. The study of the kinds and the amounts of mRNA produced by a cell under certain conditions, which are directly related to which genes are expressed, provides insights into how the cell responds to a particular perturbation.

A way to evaluate the expression of many genes in a single experiment is by using a DNA microarray, which is a collection of microscopic DNA spots immobilized in a solid surface. Each DNA spot contains picomoles of a specific DNA sequence, known as reporters (also known as probes or oligos), which can be a short section of a gene or other DNA element used to hybridize a cDNA or a cRNA. Probe-target hybridization is usually detected and quantified by detection of fluorophore, silver-labeled or chemiluminescence-labeled targets to determine relative abundance of nucleic-acid sequences in the target.

Hanagata et al. [64] carried out a whole genome-expression analysis to study the molecular responses of

lung epithelial cells to CuO NPs. After extraction of the RNA from cells exposed to CuO (or control cells), the RNAs were amplified and labeled with fluorescence probes (Cy3 and Cy5). Hybridization of the amplified RNAs with the DNA microarray was carried out for 18 h at 65°C. Then, the microarray was scanned to measure the fluorescence intensity of Cy3 and Cy5. Foreground and background median values of each spot were obtained from median values of the pixels included in each spot area. The difference between foreground and background values of each spot was established as the signal strength, and only spots with signal values >3 times the noise value were considered valid spots. The results indicated that change of gene expression involved in mitogen-activated protein-kinase (MAPK) pathways and cell-cycle progression in cells exposed to CuO NPs were similar to those in cells exposed to Cu ions [64]. With a similar approach, Mahmoudi et al. evaluated the toxicity of superparamagnetic iron oxide in different cell lines (heart, brain and kidney) [65] and Dua et al. the toxicity induced by mesoporous silica NPs, Fe₂O₃ NPs and ZnO NPs in kidney cells [66]. The findings using this approach have to be analyzed by powerful bioinformatics tools due to the large amount of data obtained. In addition, alternative methods (e.g., real time-PCR) are required for further validation of the identified targets. Examining changes in protein expression can also be very useful for better understanding of the effects of MNPs in cells [67].

Among all the proteomic approaches available, quantitative strategies are particularly attractive, since they allow for identification of differentially-expressed proteins in cells exposed to MNPs, compared to control cells. Although these approaches are extensively used in other research areas [68], they have been applied to study MNP toxicity in only a few studies. Yang et al. used two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) to identify proteins altered after exposure to SiO₂ NPs. In this study, control and cells exposed to SiO₂ NPs were differentially labeled with Cy3 and Cy5 dyes for comparison on the same gel. The labeling reaction was carried out for 30 min at 4°C in the dark and then quenched with a 50-fold molar excess of free lysine. The internal standard was labeled with Cy2 dye and use on all gels to aid image matching and cross-gel statistical analysis. The proteomic analysis revealed that 16 differentially-expressed proteins were induced by SiO₂ NPs exposure, and that the expression levels of these proteins were associated with the particle size [69].

Jeon et al. also used 2D-DIGE to analyze the hepatotoxicity induced by TiO₂ in liver cells, finding 15 altered proteins related to inflammation, apoptosis and antioxidative reaction [70]. Alternatives to 2D-DIGE [e.g., stable isotopic labeling by amino acids in cell culture (SILAC), isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) and label-free methods] should also be consid-

ered for future studies, since they generally provide better results than gel-based approaches [67].

4. *In-vivo* assessment of the toxicity of metallic nanoparticles

After *in-vitro* toxicity assays and before the pre-clinical studies, *in-vivo* assays to evaluate the toxicity of MNPs are needed to design specific and safe clinical trials to develop new strategies for the applied use of MNPs. This use includes diagnostic and/or therapeutic purposes, although large-scale use of MNPs also represents an increasing risk to health and the environment [18,71].

Several aspects of the physicochemical properties of MNPs are important to design these protocols and, of course, suitable for the biological organism in each case. The target organ in the organism chosen is also one of the major issues to test, so it is important to test hepatotoxicity, nephrotoxicity, pulmonary toxicity, spleen toxicity, immune-system activation, hematological toxicity and oxidative stress, among others [72,73]. Within the most important options to consider is the route of administering NPs, especially in higher vertebrates and mammals.

4.1. Routes of administration in common animal models

The acquisition pathway of MNPs by biological systems is determinant, in most cases, of the type and the extent of potential damage in different organs and tissues. We discuss below relevant routes of administration and doses in different animal model.

4.1.1. Skin absorption. This route of administration involves not only active absorption after direct application to the skin but also passive uptake of NPs through the skin (e.g., respiration after nebulization in a chamber or directly in the water for aquatic animals) [74].

The zebra fish is a genetically-tractable vertebrate-model organism commonly used for the *in-vivo* administration and testing of MNP toxicity. Compared to other vertebrate animal models, zebra fish have several benefits. Importantly, housing and maintenance are less expensive, making it an attractive model for preliminary studies of toxicity and/or environmental contamination. Moreover, the zebra-fish model for the assessment of toxicity is easily extrapolated to other vertebrates and humans. The short life cycle of this aquatic vertebrate makes it very suitable for the study of embryo viability and genetic malformations during treatment with NPs. Assessment of MNP toxicity in zebra fish includes immunohistochemical analysis, flow-cytometry studies to detect ROS and proteomic analysis for well-established cellular markers of stress [75]. Eurasian perch, oysters and the fruit fly share many of the zebra-fish

characteristics, so making them suitable models for toxicity studies, although they are used less frequently because their genetics are not well known.

4.1.2. Airways release. *In-vivo* toxicity of Ag NPs and Au NPs has been studied in models of sub-chronic inhalation, in trying to have a complete study of toxicity that measures the adsorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of MNPs *in-vivo* in rats [76]. These studies, although not very common, need to be done for commercial purposes and for the effects of MNPs in humans. The most important parameters are the lowest dose for an adverse effect (LOAEL) and the dose with no adverse toxicity effect included in the pre-clinical trial (NOAEL). These studies tested daily different doses (e.g., Au NPs in different groups of male and female rats with 6-h-inhalation treatment consecutively during three months). Airways, skin and mucosas (oral, nasal and genital) were checked daily and the rat's weights were monitored once a week. The analysis *pre-mortem* included biochemistry and hematologic parameters, nephrotoxicity and lung function. The *post-mortem* study comprised multi-organ histopathological analysis (including broncho-alveolar lavage). Au NPs accumulation in tissue was measured by AAS [76].

4.1.3. Systemic administration. Commonly used routes for systemic release of MNPs are intravenous (i.v.) and intraperitoneal (i.p.) injection. The systemic administration of MNPs by these two pathways allows study of their organ distribution after different time points. The organs are extracted from injected mice and accumulation of NPs is generally analyzed by ICP-MS and/or by fluorescent imaging with confocal microscopy. Interestingly, small silica-coated magnetic (50 nm) NPs containing rhodamine B isothiocyanate were recruited to the brain, through the blood-brain barrier [77], whereas Au NPs with a diameter of 100–250 nm were retained in different tissues and organs (e.g., liver, spleen, kidney, or lungs) [78].

Hematological and biochemical studies are also performed in these animals to test the toxicity of NPs in tissues and blood cells.

Another interesting approach with systemic administration of NPs is the evaluation of mutagenic potential, chromosomal aberrations and genotoxicity for germinal cell-viability studies [77,79].

4.1.4. Oral gavage. This route of administration has been studied using Cu NPs of different sizes after gavage of mice through naso-gastric probe. In this model of acute toxicity, the effect of the NPs was tested after short exposure to high doses. After determination of the LD₅₀ (lethal doses determination for 50% of the population), a complete histopathology and hematology study has to be

performed to describe the ADME parameters *in vivo* in the animal model.

Oral toxicity determination is important due to the putative use of NPs with food or orally-administrated drugs [80,81]. Moreover, oral uptake of NPs through drinking water pollutants or passive uptake from other routes of administration (e.g., airways or skin) must be taken into consideration to address the *in-vivo* toxicity of MNPs fully [82]. A single administration of NPs is performed in the acute exposure model for toxicity assessment of MNPs; hence, increasing doses of the different NPs and the control (vehicle) are administrated to the mice to detect the LD₅₀.

In an interesting study, Chen et al. tested two sizes of Cu NPs (25 nm and 17 nm), and compared the effect to that of soluble ionic Cu after administration through a nasogastric probe. This study revealed the importance of the size of the NPs for the induction of toxicity – larger NPs have a smaller surface area in contact with the organism and are, therefore, potentially less toxic than the smaller NPs or the ionic Cu. Another important conclusion from this work is that study of the different ways of administering NPs is essential to understand the difference and the specificity of the toxicity induced by MNPs. As an example, the interaction of NPs with H⁺ in the stomach after oral administration promotes an increase in the release of HCO₃⁻, which results in an increase of the pH in the stomach causing renal damage and electrolytic metabolic alterations [82].

Another important issue after oral administration of NPs is the different outcome depending on the use of males or females for toxicity tests. In this regard, males are more prone to produce H⁺ in the stomach, so they are more susceptible to develop renal damage than females [83]. All these considerations mark the importance of designing an adequate experimental model for *in-vivo* toxicity. Moreover, deep knowledge of the biology of the selected animal is needed for proper assessment of the effect of the route of administration on the toxicity induced by MNPs [82].

4.2. Alternative *in-vivo* models

Other organisms (e.g., invertebrates), which permit the analysis of ADME-toxicity parameters, have also been used for the *in-vivo* evaluation of the toxicity of MNPs. An important benefit of these models is that there is no need to refer them to bioethical committees.

4.2.1. Invertebrate organisms. In an interesting study, Novak and collaborators proposed a terrestrial invertebrate, *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) to test toxicity of TiO₂ NPs orally administered [84]. They hypothesized that the TiO₂ NP toxicity could be due to the high doses, exposure time and the ability to distribute within the whole animal body after crossing gut epithelial-cell barriers. The route of administration by feeding the

animal with TiO₂ NPs within the food intake permitted the study of several parameters (e.g., general health score of the animals). Each individual was independently exposed and the feed rate was calculated by the relation between food consumption and weight increase of each animal each day of treatment. The ability of NPs to spread throughout the whole organism was evaluated by analyzing the membrane integrity of gut epithelial cells by immunohistochemistry [84,85].

The use of biomarker organisms of environmental contamination is another interesting model to test MNP-induced toxicity. In this test, freshwater crustacean *Daphnia magna* has been used as a contamination biomarker due to its sensitivity to changes in the ecosystem [86]. Moreover, *D. magna* is part of the trophic chain base revealing important information about the accumulation of toxic effects within the rest of the organisms in the ecosystem [87,88].

In a recent work, Asghari et al. evaluated the toxicity of different groups of colloidal Ag NPs under an acute, short-term exposure model. They determined the minimum dose of Ag NPs inducing lethality in *D. magna* after 48-h administration in water containers. The toxicity score was evaluated by determining lethal doses (LD₁₀, LD₅₀ and LD₉₀), observation of birth defects and progression of paralysis. They concluded from these studies that the toxicity of Ag NPs depends on their nature and state of aggregation [89]. Similar studies have been performed by other groups to analyze the effects of Ag NPs ingested by *D. magna* [89,90].

There are benefits and disadvantages from using invertebrate models to test toxicity induced by MNPs. First, the protocols are technically easier than those for vertebrates and mammals so interpretation is easier. Invertebrates are big enough to obtain sufficient amounts of biological samples for histopathological analysis and other purposes. Another important issue is the possibility to obtain a large number of individuals to increase statistical significance. Conversely, the short experience with these models so far could be a disadvantage in using them in MNP tests. Another objection to using invertebrates is the lack of mathematical models to interpret the results properly and to extrapolate to the potential toxicity in humans. The last concern could be aggravated due to the low physiological correlation between vertebrates and invertebrates. Hence, the ideal situation for properly testing the toxicity of MNPs would be the use of both types of model animal, invertebrate and vertebrate.

4.2.2. Embryo models. Another important factor to be considered is the potential toxicity of MNPs during embryo development. To address this question, Clancy et al. developed a model of live chicken embryo in which MNPs were administered directly into the bloodstream. The use of fluorescent NPs allowed the study of their

distribution throughout the whole body, as well as the aggregation behavior, by fluorescence spectroscopy.

NPs tended to aggregate and to accumulate in blood vessels of different sizes and in tissues with high angiogenic activity. Similarly to the toxicity studies in vertebrates, the toxicity in embryo models depended on the bio-distribution of the MNPs and their physicochemical properties: size, electrical charge, and surface modifications (e.g., chitosan and fluorescent particles) [91,92].

The data obtained from live chicken embryos could be extrapolated to adult animals, so being helpful for the development of toxicity protocols. Moreover, chicken embryo is a *bona fide* model for experimentation, as their use is not regulated by ethical committees, thus avoiding legal issues [92].

4.2.3. Prokaryotic organisms. A new biological model using prokaryotic organisms was recently proposed for MNP-toxicity studies. This model is based on using bacteria able to produce bioluminescence. Bioluminescence intensity is directly related to cellular metabolism, and this correlation is used to address the toxicity of NPs. A decrease in metabolic activity induced by exposure to MNPs would decrease the bioluminescence intensity, which would indicate an increase in the toxicity induced by MNPs.

The use of bacteria with these characteristics represents a new method to address the toxicity of different MNPs in a short time period by analyzing fluctuations of light emission [93]. This characteristic of luminous bacteria has been used in promising toxicity studies for Au NPs and carbon nanotubes in assays taking just 15 min [94]. The results obtained with the luminous bacteria were comparable to those obtained with other conventional approaches used to evaluate MNP-induced toxicity [95].

5. Conclusions

We have presented the different options used to evaluate the potential toxicity of MNPs using *in-vitro* and *in-vivo* assays. Although the number of articles aiming to assess the toxicity of MNPs is increasing, there is still an urgent need for standardized protocols allowing systematic study of the toxicity induced by particular types of MNP. As we have shown, not only are concentration and the exposure times parameters that have to be considered when assessing the toxicity of MNPs, but stability, particle size, shape and aggregation state are also significant factors. Moreover, when using *in-vitro* models, the behavior may be radically different, depending on the cell line tested.

As for the *in-vivo* models, it is important to choose not only the correct animal model but also the appropriate

route of administration, since the toxic response can greatly vary.

Also, it is important to mention that, although general toxicity assays have been shown to be very useful to evaluate MNP-induced toxicity, approaches focused on identifying specific targets (genes and/or proteins) may help not only to improve understanding of the interaction mechanisms of cells and organisms with MNPs, but also to design novel non-toxic MNPs.

Acknowledgements

This work was funded by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2010-18644, CTQ2011-28328CO-01 and SAF2011-27330), and grants ANALISYC II and INDISNET 01592006 from *Comunidad de Madrid*. J.L.L.-G. was financially supported by the *Ramón y Cajal* program. I.L.-H. thanks the *Comunidad de Madrid* for a pre-doctoral scholarship.

References

- [1] D. Cui, H. Gao, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 683.
- [2] V. Rabolli, L.C.J. Thomassen, F. Uwambayinema, J.A. Martens, D. Lison, *Toxicol. Lett.* 206 (2011) 197.
- [3] K. Gerloff, I. Fenoglio, E. Carella, J. Kolling, C. Albrecht, A.W. Boots, I. Förster, R.P.F. Schins, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 646.
- [4] R.D. Handy, R. Owen, E. Valsami-Jones, *Ecotoxicology* 17 (2008) 315.
- [5] S.G. Mukherjee, N. O'Clonadh, A. Casey, G. Chambers, *Toxicol. Vitro* 26 (2012) 238.
- [6] M. Tarantola, D. Schnelder, E. Sunnick, H. Adam, S. Pierrat, C. Rosman, V. Breus, C. Sönnichsen, T. Basché, J. Wegener, A. Janshoff, *ACS Nano* 3 (2009) 213.
- [7] V. Christen, K. Fent, *Chemosphere* 87 (2012) 423.
- [8] H.A. Ngwa, A. Kanthasamy, Y. Gu, N. Fang, V. Anantharam, A.G. Kanthasamy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256 (2011) 227.
- [9] M. Al-Rawi, S. Diabaté, C. Weiss, *Arch. Toxicol.* 85 (2011) 813.
- [10] S.M. Hussain, K.L. Hess, J.M. Geahart, K.T. Geiss, J.J. Schlager, *Toxicol. Vitro* 19 (2005) 975.
- [11] Z.E. Allouni, P.J. Høl, M.A. Cauqui, N.R. Gjerdet, M.R. Cimpan, *Toxicol. Vitro* 26 (2012) 469.
- [12] M.J.D. Clift, B. Rothen-Rutishauser, D.M. Brown, R. Duffin, K. Donaldson, L. Proudfoot, K. Guy, V. Stone, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232 (2008) 418.
- [13] T. Morais, M.E. Soares, J.A. Duarte, L. Soares, S. Maia, P. Gomes, E. Pereira, S. Fraga, H. Carmo, M. de Lourdes Bastos, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80 (2012) 185.
- [14] M. Shen, H. Cai, X. Wang, X. Cao, K. Li, S.H. Wang, R. Guo, L. Zheng, G. Zhang, X. Shi, *Nanotechnology* 23 (2012) 105601.
- [15] A. Albanese, W.C.W. Chan, *ACS Nano* 5 (2011) 5478.
- [16] C. Brandenberger, M.J.D. Clift, D. Vanhecke, C. Mühlfeld, V. Stone, P. Gehr, B. Rothen-Rutishauser, *Particle Fibre Toxicol.* 7 (2010) 1.
- [17] J.H. Park, J. Park, U. Dembereldorj, K. Cho, K. Lee, S.I. Yang, S.Y. Lee, S.W. Joo, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 1631.
- [18] R. de Lima, A.B. Seabra, N. Duran, *J. Appl. Toxicol.* 32 (2012) 867.
- [19] B.J. Marquis, S.A. Love, K.L. Braun, C.L. Haynes, *Analyst* (Cambridge, UK) 134 (2009) 425.
- [20] H.E. Pace, E.K. Leshner, J.F. Ranville, *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (2010) 1338.
- [21] F. Watari, N. Takashi, A. Yokoyama, M. Uo, T. Akaska, Y. Sato, S. Abe, Y. Totsuka, K. Tohij, *J.R. Soc. Interface* 6 (2009) S371.
- [22] R. Allabashi, W. Stach, A. de la Escosura-Muniz, L. Liste-Calleja, A. Merkoci, *J. Nanopart. Res.* 11 (2009) 2003.
- [23] M.C. Wende, J.A.C. Broekaert, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 370 (2001) 513.
- [24] M. Resano, F. Vanhaecke, M.T.C. de Loos-Vollebregt, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 1450.
- [25] A. Scheffer, C. Engelhard, M. Sperling, W. Buscher, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 249.
- [26] W. Zhang, Y. Ji 2, J. Meng, X. Wu, H. Xu, *PLoS ONE* 7 (2012) e31957.
- [27] D.A. Navarro, M.A. Bisson, D.S. Aga, *J. Hazard. Mater.* 211–212 (2012) 427.
- [28] A. Sarmiento-Gonzalez, J.R. Encinar, J.M. Marchante-Gayon, A. Sanz-Medel, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 335.
- [29] J.L. Tang, L. Xiong, S. Wang, J.Y. Wang, L. Liu, J. Li, F.Q. Yuan, T.F. Xi, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9 (2009) 4924.
- [30] M.M. Song, W.J. Song, H. Bi, J. Wang, W.L. Wu, J. Sun, M. Yu, *Biomaterials* 31 (2010) 1509.
- [31] Y. Hayashi, P. Engelmann, R. Foldbjerg, M. Szabo, I. Somogyi, E. Pollák, L. Molnár, H. Autrup, D.S. Sutherland, J. Scott-Fordsmand, L.H. Heckmann, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 4166.
- [32] F. Liu, *J. Chromatogr., A* 1216 (2009) 9034.
- [33] K. Teide, A.B.A. Boxall, X. Wang, D. Gore, D. Tiede, M. Baxter, H. David, S.P. Tear, J. Lewis, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1149.
- [34] U. Kumtabtim, J. Shiowatana, A. Siripinyanond, *J. Anal. At. Spectrom.* (20) (2005) 1185.
- [35] A. Samontha, J. Shiowatana, A. Siripinyanond, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 973.
- [36] A. Oukarroum, S. Bras, F. Perreault, R. Popovic, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 78 (2012) 80.
- [37] S.Y. Choi, S. Jeong, S.H. Jang, J. Park, J.H. Park, K.S. Ock, S.Y. Lee, S.W. Joo, *Toxicol. Vitro* 26 (2012) 229.
- [38] G.D. Zhang, Z. Yang, W. Lu, R. Zhang, Q. Huang, M. Tian, L. Li, D. Liang, C. Li, *Biomaterials* 30 (2009) 1928.
- [39] J.G. Teeguarden, P.M. Hinderliter, G. Orr, B.D. Thrall, J.G. Pounds, *Toxicol. Sci.* 95 (2007) 300.
- [40] A.M. Alkilany, P.K. Nagaria, C.R. Hexel, T.J. Shaw, C.J. Murphy, M.D. Wyatt, *Small* 5 (2009) 701.
- [41] J. Chan, T. Ying, Y.F. Guang, L.X. Lin, T. Kai, Z.V. Fang, Y.X. Ting, L.F. Xing, Y.Y. Ji, *Biol. Trace Elem. Res.* 144 (2011) 183.
- [42] T. Hasezaki, K. Isoda, M. Kondoh, Y. Tsutsumi, K. Yagi, *Pharmazie* 66 (2011) 698.
- [43] X. Lu, J.C. Qian, H.J. Zhou, Q. Gan, W. Tang, J.X. Lu, Y. Yuan, C.S. Liu, *Int. J. Nanomed.* 6 (2011) 1889.
- [44] H. Luo, F. Wang, Y. Bai, T. Chen, W. Zheng, *Colloids Surf., B* 94 (2012) 304.
- [45] H.K. Patra, S. Banerjee, U. Chaudhuri, P. Lahiri, A.K. Dasgupta, *Nanomed. Nanotechnol.* 3 (2007) 111.
- [46] R.M. Zucker, E.J. Massaro, K.M. Sanders, L.L. Degn, W.K. Boyes, *Cytometry Part A* 77A (2010) 677.
- [47] X. Han, N. Corson, P. Wade-Mercer, R. Gelein, J. Jiang, M. Sahu, P. Biswas, J.N. Finkelstein, A. Elder, G. Oberdörster, *Toxicology* 297 (2012) 1.
- [48] C. Uboldi, G. Giudetti, F. Broggi, D. Gilliland, J. Ponti, F. Rossi, *Mutat. Res.* 745 (2012) 11.
- [49] J.-H. Yuan, Y. Chen, H.-X. Zha, L.-J. Song, C.-Y. Li, J.-Q. Li, X.-H. Xia, *Colloids Surf., B* 76 (2010) 145.
- [50] C. Harris, J.M. Hansen, *Methods Mol. Biol.* 889 (2012) 325.
- [51] M. Könczöl, S. Ebeling, E. Goldenberg, F. Treude, R. Gminski, R. Gieré, B. Grobety, B. Rothen-Rutishauser, I. Merfort, V. Mersch-Sundermann, *Chem. Res. Toxicol.* 24 (2011) 1460.
- [52] I. Passagne, M. Morille, M. Rousset, I. Pujalté, B. L'Azou, *Toxicology* 299 (2012) 112.
- [53] J.J. Li, D. Hartono, C.-N. Ong, B.-H. Bay, L.-Y.L. Yung, *Biomaterials* 31 (2010) 5996.

- [54] V. Sharma, D. Anderson, A. Dhawan, *Apoptosis* 17 (2012) 852.
- [55] E.-J. Park, J. Yi, K.-H. Chung, D.-Y. Ryu, J. Choi, K. Park, *Toxicol. Lett.* 180 (2008) 222.
- [56] J. Ahmad, M. Ahamed, M.J. Akhtar, S.A. Alrokayan, M.A. Siddiqui, J. Musarrat, A.A. Al-Khedhairy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259 (2012) 160.
- [57] M. van Gurp, N. Festjens, G. van Loo, X. Saelens, P. Vandenabeele, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304 (2003) 487.
- [58] T. Chen, Y.-S. Wong, W. Zheng, Y. Bai, L. Huang, *Coll. Surf. B* 67 (2008) 26.
- [59] K. Meyer, P. Rajanahalli, M. Ahamed, J.J. Rowe, Y. Hong, *Toxicol. Vitro* 25 (2011) 1721.
- [60] S. Cotelle, J.F. Férard, *Environ. Mol. Mutagen.* 34 (1999) 246.
- [61] R. Meena, M. Rani, R. Pal, P. Rajamani, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167 (2012) 791.
- [62] C. Gong, G. Tao, L. Yang, J. Liu, H. He, Z. Zhuang, *Mol. Biol. Rep.* 39 (2012) 4915.
- [63] G. Speit, P. Schütz, I. Bonzheim, K. Trenz, H. Hoffmann, *Toxicol. Lett.* 146 (2004) 151.
- [64] N. Hanagata, F. Zhuang, S. Connolly, J. Li, N. Ogawa, M. Xu, *ACS Nano* 5 (2011) 9326.
- [65] M. Mahmoudi, S. Laurent, M.A. Shokrgozar, M. Hosseinkhani, *ACS nano* 5 (2011) 7263.
- [66] P. Dua, K.N. Chaudhari, C.H. Lee, N.K. Chaudhari, S.W. Hong, J.-S. Yu, S. Kim, D.-K. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* 32 (2011) 2051.
- [67] J.L. Luque-Garcia, P. Cabezas-Sanchez, C. Camara, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 703.
- [68] J.L. Luque-Garcia, J.L. Martinez-Torrecuadrada, C. Epifano, I. Babel, M. Cañamero, I. Casal, *Proteomics* 10 (2010) 940.
- [69] X. Yang, J. Liu, H. He, L. Zhou, C. Gong, X. Wang, L. Yang, J. Yuan, H. Huang, L. He, B. Zhang, Z. Zhuang, *Particle Fibre Toxicol.* 7 (2010) 1.
- [70] Y.-M. Jeon, S.-K. Park, M.-Y. Lee, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54 (2011) 852.
- [71] C.A. Simpson, K.J. Salleng, D.E. Cliffler, D.L. Feldheim, *Nanomedicine* (2012) <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2012.06.002>.
- [72] K.L. Aillon, Y. Xie, N. El-Gendy, C.J. Berkland, M.L. Forrest, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 457.
- [73] V. Kumar, A. Kumari, P. Guleria, S.K. Yadav, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 215 (2012) 39.
- [74] R.J. Griffitt, J. Luo, J. Gao, J.C. Bonzongo, D.S. Barber, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1972.
- [75] Y.L. Hu, W. Qi, F. Han, J.Z. Shao, J.O. Gao, *Int. J. Nanomed.* 6 (2011) 3351.
- [76] J.H. Sung, J.H. Ji, J.D. Park, M.Y. Song, K.S. Song, H.R. Ryu, J.U. Yoon, K.S. Jeon, J. Jeong, B.S. Han, Y.H. Chung, H.K. Chang, J.H. Lee, D.W. Kim, B.J. Kelman, I.J. Yu, *Particle Fibre Toxicol.* 8 (2011) 16.
- [77] J.S. Kim, T.J. Yoon, K.N. Yu, B.G. Kim, S.J. Park, H.W. Kim, K.H. Lee, S.B. Park, J.K. Lee, M.H. Cho, *Toxicol. Sci.* 89 (2006) 338.
- [78] W.H. De Jong, W.I. Hagens, P. Krystek, M.C. Burger, A.J. Sips, R.E. Geertsma, *Biomaterials* 29 (2008) 1912.
- [79] H. Xie, M.M. Mason, J.P. Wise, *Rev. Environ. Health* 26 (2011) 251.
- [80] G. Oberdorster, E. Oberdorster, J. Oberdorster, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 823.
- [81] G.M. Hodges, E.A. Carr, R.A. Hazzard, C. O'Reilly, K.E. Carr, *J. Drug Target.* 3 (1995) 57.
- [82] Z. Chen, H. Meng, G. Xing, C. Chen, Y. Zhao, G. Jia, T. Wang, H. Yuan, C. Ye, F. Zhao, Z. Chai, C. Zhu, X. Fang, B. Ma, L. Wan, *Toxicol. Lett.* 163 (2006) 109.
- [83] S.K. Lam, *Clin. Gastroenterol.* 14 (2000) 41.
- [84] S. Novak, D. Drobne, A. Menard, *Zookeys* 176 (2012) 261.
- [85] A. Jemec, D. Drobne, M. Remskar, K. Sepcic, T. Tisler, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1904.
- [86] D. Drobne, A. Jemec, Z. Pipan-Tkalec, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 1157.
- [87] S. Asghari, S.A. Johari, J.H. Lee, Y.S. Kim, Y.B. Jeon, H.J. Choi, M.C. Moon, L.J. Yu, *J. Nanobiotechnol.* 10 (2012) 14.
- [88] A.J. Kennedy, M.S. Hull, A.J. Bednar, J.D. Goss, J.C. Gunter, J.L. Bouldin, P.J. Vikesland, J.A. Steevens, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 9571.
- [89] H.J. Allen, C.A. Impellitteri, D.A. Macke, J.L. Heckman, H.C. Poynton, J.M. Lazorchak, S. Govindaswamy, D.L. Roose, M.N. Nadagouda, *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (2010) 2742.
- [90] S. Zhu, E. Oberdorster, M.L. Haasch, *Marine, Environ. Res.* 62 (2006) S5.
- [91] A.A. Clancy, Y. Gregoriou, K. Yaehe, D.R. Cramb, *Chem. Phys. Lett.* 488 (2010) 99.
- [92] M.Y. Wani, M.A. Hashim, F. Nabi, M.A. Malik, *Adv. Phys. Chem.* 2011 (2011) 1.
- [93] S. Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji, *Environ. Int.* 32 (2006) 265.
- [94] H. Zheng, L. Liu, Y. Lu, Y. Long, L. Wang, K.P. Ho, K.Y. Wong, *Anal. Sci.* 26 (2010) 125.
- [95] J. Lappalainen, R. Juvonen, J. Nurmi, M. Karp, *Chemosphere* 45 (2001) 635.

IV.2. Las Nanopartículas de Selenio inhiben el carácter invasivo de las células de hepatocarcinoma humano y bloquean su ciclo celular a través del complejo eIF3

“Selenium nanoparticles inhibit in-vitro invasiveness and induce eIF3-mediated cell cycle arrest”

ACS Nano (*Enviado*)

Los resultados de este trabajo se presentaron en:

“7th International Franco-Spanish Workshop on Bio-Inorganic Analytical Chemistry”. Gijón, España, Julio 2012. Tipo de presentación: Comunicación oral.

“III Jornadas Bienales de Jóvenes Investigadores en Proteómica”. Santiago de Compostela, España, Febrero 2012. Tipo de presentación: Póster.

“XIII Jornadas de Análisis Instrumental”. Barcelona, España, Noviembre 2011. Tipo de presentación: Comunicación oral

Selenium nanoparticles inhibit in-vitro invasiveness and induce eIF3-mediated cell cycle arrest

Isabel Lopez-Heras[†], Raquel Sanchez-Diaz[†], Daniela S. Anunciação[‡], Yolanda Madrid, Jose L. Luque-Garcia^{†,*}, Carmen Camara[†]

[†] Departamento de Química Analítica. Universidad Complutense de Madrid. Avda Complutense s/n 28040 Madrid, Spain.

[‡] Departamento Química Analítica, Universidade Federal da Bahia, Campus Universitário de Ondina, s/n CEP 40170-290, Salvador, BA, Brazil.

ABSTRACT

Selenium nanoparticles have been recently proposed as a potential chemotherapeutic agent due to its low toxicity and its ability to arrest the cell cycle of cancer cells. However, the biochemical mechanisms associated to this effect have not yet been uncovered. We evaluate here the potential of selenium nanoparticles to induce cell cycle arrest and to inhibit in-vitro invasiveness. In addition, we use a quantitative proteomic approach to identify potential protein targets involved in the mechanisms associated to selenium nanoparticles exposure. Our data suggest that the induction of the cell cycle arrest at the G1/S transition is mediated by de-regulation of the eIF3 protein complex. We found additional de-regulated proteins upon selenium nanoparticles exposure that could also be involved in the overall inhibition of cell proliferation. These findings not only support the potential of selenium nanoparticles as anti-cancer therapy but also provide a deeper insight into the mechanisms associated to their chemotherapeutic effects.

KEYWORDS: selenium nanoparticles; cell cycle arrest; eIF3 protein complex; inhibition of invasiveness.

INTRODUCTION

Selenium is one of the essential trace elements and has great importance in nutrition and medicine due to its antioxidant properties. The relationship between selenium intake/status and several health outcomes such as cancer, cardiovascular disease, diabetes and male fertility have been recently reviewed by Fairweather-Tait et al.¹ It is known that the dose and the chemical form of selenium have a significant influence on these beneficial effects.^{2,3}

Selenium nanoparticles (SeNPs), which are considered a novel Se compound, are attracting increasing attention of the scientific community due to their excellent antioxidants properties and low toxicity in comparison with other Se-species such as selenomethionine (SeMet)⁴ and selenium methyl selenocysteine (SeMeSeCys).⁵ Jin-Song et al. demonstrated that selenite and SeNPs had a similar behavior and antioxidant effects on cells by stimulating the synthesis of glutathione peroxidase (GPx), phospholipidhydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) and thioredoxinreductase (TR).⁶ However, It has also been reported that SeNPs exhibit a great selectivity between cancer and normal cells showing a broad spectrum of growth inhibition for A375, CNE2, MCF-7 and HepG2 cancer cells. This effect was more pronounced than when using selenite at a similar concentration.⁷ Recently, it has also been shown the anti-proliferative effect of SeNPs on HeLa and MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner by induction of cell cycle arrest.⁸ However, the biomolecular mechanisms involved in this inhibitory effect have not yet been fully understood.

Proteomics is a powerful tool for describing complete proteomes at the organelle, cell, organ or tissue levels. Among all the proteomic approaches available, quantitative strategies are particularly attractive, since they allow for identification of differentially expressed proteins by comparing proteomes as affected by different conditions.⁹ In this way, the identification of changes in individual proteins or group of proteins associated with SeNPs exposure could help to gain insight into the mechanisms of action of these NPs.¹⁰ Between the different alternatives for relative protein quantitation, stable isotopic labeling by amino acids in cell culture (SILAC) is one of the most reliable alternatives. Metabolic incorporation of labeled amino acids into all proteins from cells of one of the samples, and subsequent combination of labeled and unlabeled samples in equal ratios, enables quantification of proteins from the two samples. Within the same mass spectrometric experiment, tandem mass spectrometry

(MS/MS) can be carried out to obtain sequence information for protein identification.^{11,12}

In this work, we investigated the potential cytotoxic effects of SeNPs and the biological mechanisms involved in the interaction of SeNPs with a human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. We evaluated key parameters such as cellular viability, cellular uptake and localization, apoptosis and cell cycle pattern. In addition, we used SILAC for the identification of specific protein targets affected upon SeNPs exposure. Our data allowed us to dissect the mechanism by which SeNPs induce cell cycle arrest at the G1/S transition. We conclude that SeNPs-induced de-regulation of the eIF3 protein complex affect the protein synthesis machinery inhibiting cell cycle progression. Finally, we demonstrated that exposure to SeNPs inhibit *in-vitro* invasiveness of HepG2 cells, thus supporting the idea of SeNPs as a potential chemotherapeutic agent.¹³⁻¹⁵

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis, Characterization, Stability and Cytotoxicity of SeNPs. In a previous report, Bai et al.¹⁶ demonstrated the capability of monosaccharides (glucose), oligosaccharides (sucrose) and polysaccharides (chitosan) to modify the size, morphology and stability of SeNPs in liquid dispersions. We used chitosan since previous studies have shown how encapsulation of selenite into chitosan significantly improved the antioxidant properties and promoted a high retention of selenium in cells.^{17,18} In our method, the synthesized SeNPs were enwrapped by chitosan forming strong hydrogen bonds between the hydroxyl groups of chitosan and the ascorbic acid and the selenite. The amino groups were positively charged in acetic acid media (pH 3.2) favoring SeNPs dispersion by charge repulsions.¹⁹ We used transmission electron microscopy (TEM) to characterize the synthesized SeNPs under different concentrations of chitosan (ranging from 0.01% to 0.1%) in terms of particle size, morphology and aggregation. In all cases SeNPs presented a spherical structure with particle size between 10 nm to 60 nm. However, the size distribution was significantly affected by the concentration of chitosan. 0.1% chitosan provided a homogeneous dispersion in which around 80-90% of the SeNP had a size in the range 40-60 nm (Figure 1A) and thus, we selected this concentration for further experiments.

We evaluated the stability and aggregation of the synthesized SeNPs stored at 4°C for up to two months. We did not observe significant differences in the TEM

images as for changes in particle size and aggregation during this time. In addition, no flocculation was visually detected. We also examined the potential oxidation of SeNPs to Se(IV) weekly by centrifugation of the SeNPs suspension using 10 KDa cut-off filter. The total Se present in the liquid fraction was quantified by inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). We only found a low percentage of ionic Se (< 0.1%), thus showing the good stability of the synthesized SeNPs.

It has been reported that NPs are prone to be covered by proteins present in culture media during *in vitro* assays; thus altering the interaction of the NPs with the cells, or inducing NPs aggregation, which could reduce their mobility, uptake by living cells and cytotoxicity.²⁰⁻²² Jiang *et al.* showed a gradual aggregation of SeNPs in culture media with increasing SeNPs concentrations, and the different influence of these aggregates on the cytotoxic effects.²³ We tested the viability of human hepatocarcinoma (HepG2) cells exposed to different concentrations (between 0.1-20 µg/mL) of SeNPs during 24h and 48h. We did not observe significant aggregation of SeNPs in the culture media. As in previous studies,^{24,25} cell viability decreased with increasing NPs concentration and exposure times (Figure 1B). High SeNPs concentrations (10 and 20 µg/mL) caused an almost 100% decrease on cell viability after 24h, while the lowest concentration (0.5 µg/mL) did not significantly affect cell viability after 48h exposure time. 1 µg/mL SeNPs and 48h exposure time induced a 30% decrease in cell viability as compared to control cells. Thus, we selected this last condition as optimum for further experiments.

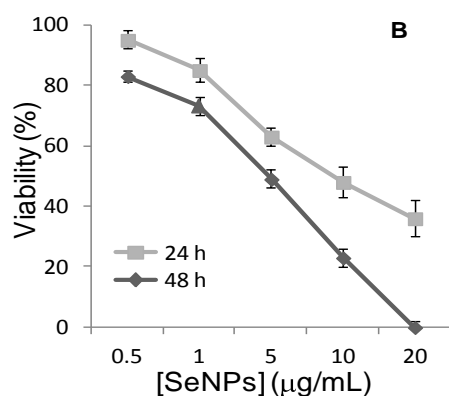
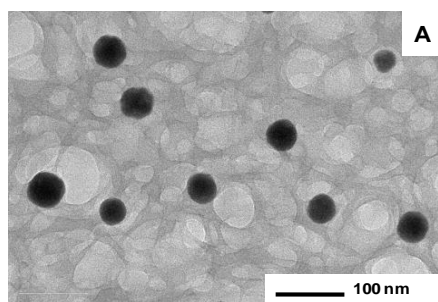


Figure 1. The use of 0.1% chitosan as stabilizer provided a homogeneous SeNPs suspension with around 80-90% of NPs in the range 40-60 nm. Cell viability of HepG2 cells exposed to SeNPs decreased in a dose-dependent manner. (A) Transmission electron microscopy of SeNPs synthesized in the presence of 0.1% chitosan. (B) Cell viability of HepG2 cells exposed to different concentrations of SeNPs at different times. The MTT assay showed that high concentrations (10-20 µg/mL of SeNPs) caused an almost 100% decrease in the cell viability. Exposure conditions of 1 µg/mL of SeNPs and 48 h induced a 30% decrease in cell viability and were selected for further experiments.

Cellular uptake and localization of SeNPs. The degree of cellular internalization is a potentially relevant factor for understanding the biological mechanisms affected by SeNPs exposure. Many authors have reported a close correlation between intracellular uptake and cytotoxic effects.²⁶ We determined the total Se in the cell culture media, in PBS washing solution and in the pellet of cells exposed to 1 µg/mL SeNPs for 48 h by ICP-MS.²⁷ The data obtained showed that the majority of Se was found in the culture media and that only 1% of the total Se added was internalized by the cells after 48h. These results showed how even small amounts of NPs could greatly alter cell functioning.

We then used TEM for cellular localization of the internalized SeNPs with two purposes: (i) to discard the possibility of potential oxidation of SeNPs in contact with the cells, since our ICP-MS analysis could not differentiate between SeNPs and other potential oxidized forms of Se; (ii) To confirm whether or not the SeNPs were really inside the cells or just attached to the cell membranes. As shown in Figure 2, SeNPs were uptaken by HepG2 cells, localized in vacuoles (Figure 2A), also distributed throughout the cytoplasm (Figure 2B) and in subcellular organelles such as mitochondria and the endoplasmic reticulum (ER) (Figures 2C and 2D). These two organelles play an important role in different processes including cellular energy supplying, differentiation and apoptosis.²⁸ While mitochondria is one of the most sensitive organelles to many exogenous compounds and in fact, several studies have reported that NPs localized in mitochondria may induce mitochondrial structure damage through oxidative stress;²⁹⁻³² recent studies suggest that the ER is quite sensitive to oxidative damage and may also play an important role in the response to oxidative stress-induced damage.³²⁻³⁶ As expected, SeNPs were not localized in the nuclei due to their particle size, thus reducing the possibility of DNA damage. In addition, about 90% of cells exposed to SeNPs exhibit more than 2-fold increased in the number of vacuoles as compared to control cells (Figure 2E and 2F). These results agree well with a previous study by Huang et al. where formation of membrane fusion vesicles during active endocytosis was induced in breast adenocarcinoma cells exposed to SeNPs.³⁷

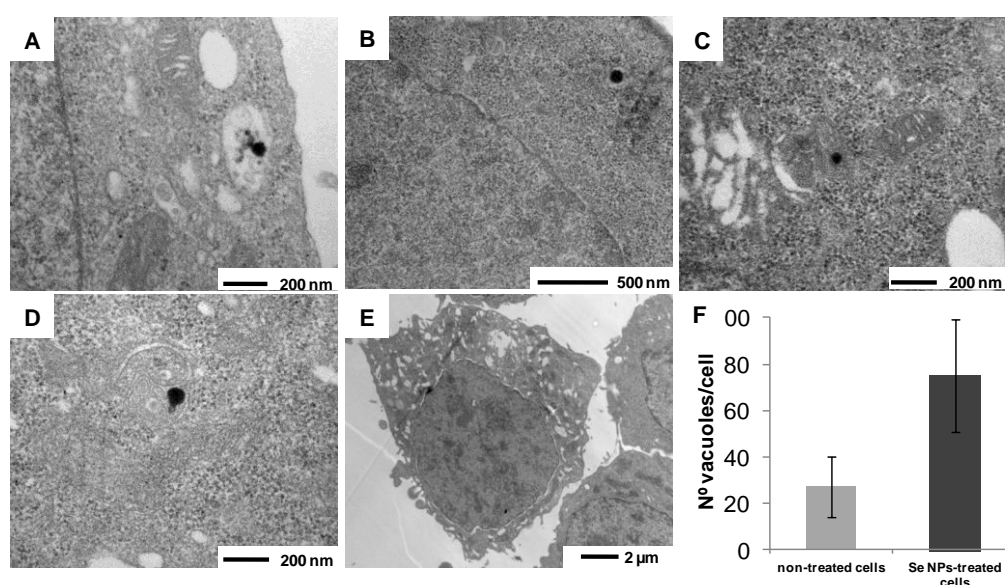


Figure 2. Transmission electron microscopy showed that SeNPs uptaken by HepG2 cells are localized in (A) vacuoles, (B) throughout the cytoplasm and in subcellular organelles such as (C) mitochondria and (D) the endoplasmic reticulum. As expected, SeNPs were not localized in the nuclei due to their particle size. (E, F) About 90% of cells exposed to SeNPs exhibit more than 2-fold increased in the number of vacuoles as compared to control cells.

SeNPs induce cell cycle arrest. We assessed the degree of apoptosis and necrosis in cells exposed to SeNPs by flow cytometry. We did not observe significant differences in the number of apoptotic or necrotic cell populations between control and SeNPs-exposed cells (Figure 3A), which correlates well with the fact that chromosome condensation and nuclear fragmentation, which are typical features for apoptotic cells, were not observed by TEM in the cells exposed to SeNPs.

We also used flow cytometry to further investigate the influence of SeNPs exposure on the cell cycle patterns of HepG2 cells by measuring the content of DNA (Figure 3C.1 and 3C.2). After exposure to SeNPs, the number of cells in G0/G1 increased to the same point that the populations in S-G2/M decreased. In fact, we observed that the population of cells in phase G2/M was almost absent in SeNPs-exposed cells. Thus, our results suggest that SeNPs induce cell cycle arrest at the S phase, which is in agreement with a previous study by Luo et al. using HeLa and MDA-MB-231 cells.⁸

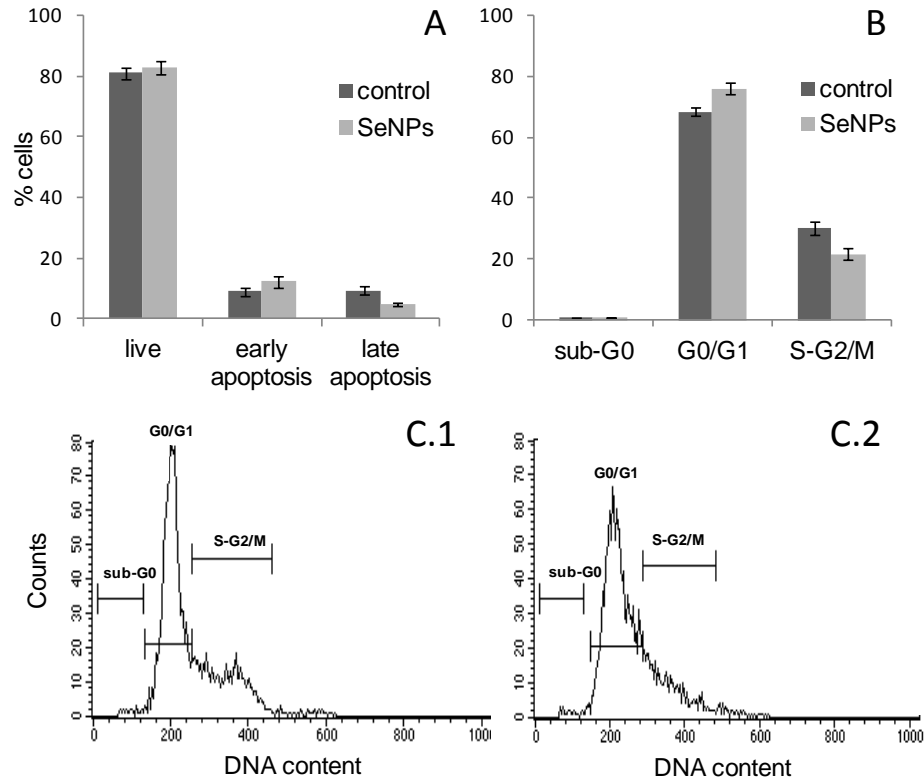


Figure 3. SeNPs exposure of HepG2 cells did not induce apoptosis but a cell cycle arrest at the G1/S transition. (A) Annexin-V-based flow cytometry analysis did not reveal a significant increase in apoptosis after SeNPs exposure. (B) Measurement of the DNA content by flow cytometry of SeNPs-exposed cells showed that the number of cells in G0/G1 increase to the same point that the populations in S-G2/M decrease as compared to control cells. (C) The population of cells in phase G2/M was almost absent in (C.2) SeNPs-exposed cells as compared to (C.1) control cells.

Differential protein expression of SeNPs-exposed HepG2 cells. To identify the proteins altered after SeNPs exposure, we performed two large-scale SILAC experiments (Figure 4A). MS analysis identified a total of 1170 proteins with at least one unique peptide in the two SILAC experiments and a false discovery rate of 0.4% estimated from the number of hits against the reverse sequence/total hits ratio, $p > 0.01$. However, only 488 proteins passed the criteria established for protein quantitation, which include identification of at least two unique peptides with a MASCOT score > 39 for the peptides and > 46 for the full protein (Supplemental Table S1). The global overlap between the two SILAC experiments was 69%. We then focused on proteins with at least 1.3-fold difference between control and exposed cells and with 20% as the

maximum relative standard deviation between peptides within each protein. Most of the identified proteins had a SILAC ratio close to 1. Judge by this criteria, 41 proteins were considered significantly altered in SeNPs exposed HepG2 cells compared with control cells. Of these, 21 were up-regulated and 20 down-regulated (Table 1).

For an unbiased search of pathways involved in SeNPs exposure, we submitted the 41 altered proteins to knowledge-based Ingenuity pathway analysis (IPA). This allowed us to identify enriched canonical pathways involved in cell growth, cell proliferation, protein synthesis, DNA replication, nucleic acid metabolism, post-translational modification and cellular death. We also classified the differentially expressed proteins to their molecular and cellular functions using the gene ontology (GO) database. We found altered proteins involved in cell cycle regulation, cellular compromise, cellular growth and proliferation, amino acid metabolism and cell morphology (Figure 4B).

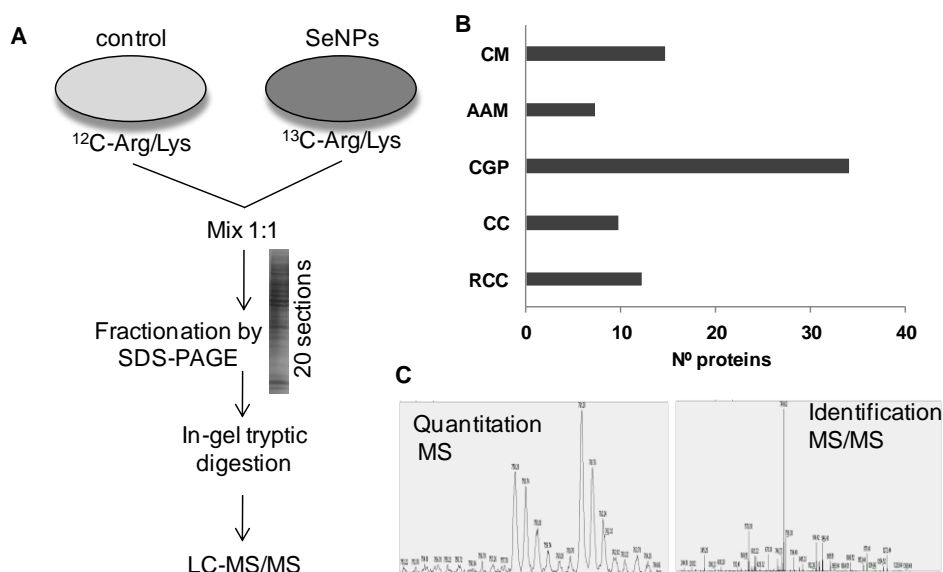


Figure 4. (A) A quantitative proteomic approach based on stable isotopic labeling by amino acids in cell culture (SILAC) identified a set of de-regulated proteins upon SeNPs exposure. (B) Altered proteins were involved in cell cycle regulation (RCC), cellular compromise (CC), cellular growth and proliferation (CGP), amino acid metabolism (AAM) and cell morphology (CM). Among these found de-regulated proteins, several subunits of the eIF3 protein complex, involved in the protein synthesis machinery, appeared down-regulated after SeNPs exposure. (C) Quantification of proteins was carried out using the MS spectra while the identifications were performed based on MS/MS data.

SeNPs exposure affects the expression of the eIF3 protein complex. The alteration of proteins involved in cell growth, cell development and protein synthesis by SeNPs exposure may be closely related with the cell cycle inhibitory effect observed in exposed HepG2 cells. Protein synthesis is closely integrated with other metabolic pathways, influencing transcription, protein turnover and early development. Among the de-regulated proteins found in our SILAC experiments, we identified down-regulated two eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunits (eIF3m and eIF3d). The eIF3 complex, formed by thirteen protein subunits, is considered the largest of the initiation factors, since the regulation of the protein synthesis and protein degradation machinery is coordinated through some eIF3 subunits.³⁸ eIF3 has two main roles in protein synthesis: first, eIF3 binds to the 40S ribosome and facilitates loading of the Met-tRNA/eIF2·GTP ternary complex to form the 43S pre-initiation complex; and secondly, eIF3 apparently assists eIF4 in recruiting mRNAs to the 43S complex.³⁹

eIF3m is associated to different mRNAs encoding proteins involved in nucleic acid metabolism, transporter proteins and proteins of unknown function.⁴⁰ It has been observed that the eIF3m subunit is highly expressed in many human cancer cell lines and its overexpression can be related to tumor progression. In addition, down-regulation of eIF3m reduces the proliferation of carcinogenic cells. Goh *et al.* silenced the expression of the eIF3m subunit by specific siRNA and confirmed the influence of eIF3m on cell proliferation, cell cycle progression and cell death in human colon cancer cell line HCT-116 by decreasing the CDC25A activity, which is required for progression from G1 to the S phase of the cell cycle.⁴¹ Based on the evidences reported in previous studies, and the down-regulation of the eIF3m and eIF3d subunits observed in our SILAC approach after SeNPs exposure, we hypothesized that the inhibition of the expression of the eIF3 complex could be directly related with the inhibitory effect of SeNPs on the proliferation of HepG2 cells.

Another subunit, eIF3a, involved in cell proliferation and tissue development has also been found highly overexpressed in several human and murine cancer tissues.⁴²⁻⁴⁶ In fact, many studies have reported the role of eIF3a as an early differentiation marker in human mammary carcinoma cells, although the role of this subunit in oncogenesis is still unclear. While some reports have proven the role of eIF3a in cancer development, other results have suggested that it could actually act against evolution into higher malignancy.⁴⁷ The eIF3b subunit is considered to be the major scaffolding

subunit.^{48,49} Liang et al. showed that eIF3b has an important role in human glioblastoma development and the knockdown of its expression significantly inhibited glioblastoma cells proliferation.⁵⁰ In addition, Wang et al. also suggested that the protein synthesis machinery can be significantly inhibited in human colorectal cancer cells by decreasing the expression of the eIF3b subunit.⁵¹ Since we did not identify either the eIF3a and the eIF3b subunit in our SILAC approach, we performed an immunofluorescence assay to evaluate the level of expression of these subunits after exposure to SeNPs (Figure 5). The expression of both subunits appeared significantly inhibited after exposure of HepG2 cells to 1.0 µg/mL of SeNPs for 48h. These results also support the proteomic data obtained and suggest that exposure to SeNPs inhibit the levels of expression of the eIF3 complex, which is closely related to the inhibition of cell proliferation.

In spite of the results showed before, we found one of the eIF3 subunits, eIF3f, overexpressed in our SILAC approach. Although this result may appears contradictory with our previous conclusions, surprisingly, eIF3f is involved in the development and apoptosis of tumor cells by interacting with CDK11.^{52,53} In fact, Shi *et al.* demonstrated that eIF3f appeared down-regulated in most human tumors and its ectopic expression inhibited translation and cellular protein synthesis in pancreatic cancer cells, inducing them to enter apoptosis. Protein synthesis was significantly lower in eIF3f-overexpressing cells compared to those transfected with the vector alone.⁵⁴ The fact that we found eIF3f up-regulated while other eIF3 subunits were down-regulated strongly support the idea that SeNPs induce cell cycle arrest at the G1/S transition mediated by de-regulation of the eIF3 protein complex.

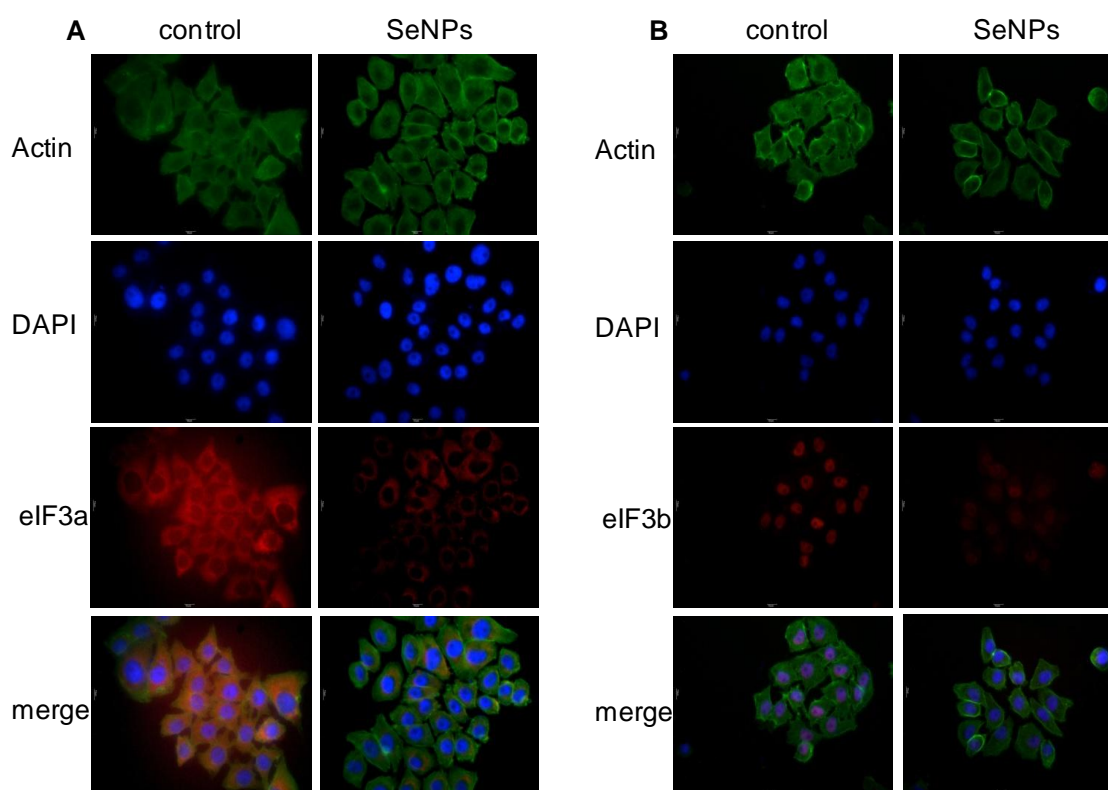


Figure 5. The expression of the eIF3 complex is altered after exposure of HepG2 cells to 1.0 $\mu\text{g/mL}$ of SeNPs for 48h. Control and SeNPs-exposed HepG2 cells were immunostained for actin filaments (green) with phalloidin, for nuclei (blue) with DAPI and for (A) eIF3a and (B) eIF3b (red). Note that both, eIF3a and eIF3b subunits staining intensities decrease significantly in cells exposed to SeNPs.

SeNPs induce eIF3-mediated cell cycle arrest. To support the idea that the mechanism by which SeNPs induce cell cycle arrest at the G1/S transition is by inhibiting the expression of most subunits of the eIF3 complex, thus affecting the protein synthesis machinery, we investigated whether siRNA-mediated gene knock down of the eIF3b subunit induces cell cycle arrest in a similar manner to SeNPs exposure in HeLa cells. After validating the suitability of the transfection (Figure 6A) by Western Blot, we analyzed the cell cycle pattern of transfected cells and cells exposed to SeNPs by flow cytometry (Figure 6B). Silencing of the eIF3b expression partially decreased the cell population in G2/M phase while increased the population in the G0/G1 phase. The differences observed as compared to control cells, were similar to those obtained after SeNPs exposure. These results, together with the different level of

expression found for eIF3 subunits after SeNPs exposure that we showed previously, support the hypothesis that SeNPs induce eIF3-mediated cell cycle arrest.

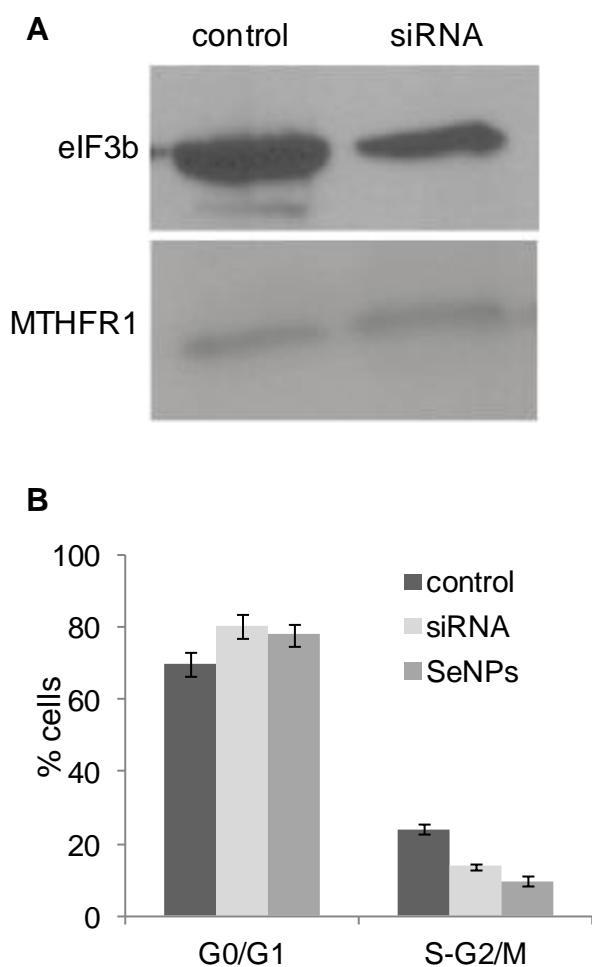


Figure 6. siRNA knockdown of the eIF3b subunit induces cell cycle arrest in a similar manner to SeNPs in HeLa cells. (A) The suitability of the transfection was validated by Western Blot using the methyl-tetrahydrofolatereductase (MTHFR1) as loading control since it showed a SILAC ratio closed to 1. (B) Silencing of the eIF3b expression partially decreased the cell population in G2/M phase while increased the population in the G0/G1 phase. The results obtained after knocking down eIF3b were similar to those obtained after SeNPs exposure.

SeNPs inhibit in-vitro invasiveness of HepG2 cells. Based on our results, SeNPs could be potentially used as an anti-cancer drug due to its ability for inhibiting cell proliferation. In order to evaluate the capacity of SeNPs to preclude cell invasion, we used a matrigel cell culture. Matrigel has been widely used for *in vitro* and *in vivo*

studies on cell differentiation, tumor growth, repair of epithelial tissue and angiogenesis.⁵⁵⁻⁵⁷ It is known that the differentiation response on matrigel is dependent on the cell type being easily distinguished malignant and non-malignant cells by their morphology when they are cultured on the surface of this basement membrane matrix.⁵⁸ Although this type of assay is less quantitative than the invasion method, the morphological differences observed may be used to predict the tumoral behavior of tested cell lines. We observed that HepG2 control cells migrated over the surface of matrigel forming large cellular branches (Figure 7A), whereas cells exposed to 0.5 $\mu\text{g/mL}$ SeNPs formed a less branched culture (Figure 7B). The invasive behavior decreased with increasing concentrations of SeNPs and in fact, the morphology of cells exposed to 1.0 $\mu\text{g/mL}$ SeNPs was very different from control cells, appearing round and individuals (Figure 7C) with no ramifications. These results support the idea that down-regulation of several eIF3 subunits by SeNPs exposure may hampers translation of mRNAs responsible for encoding proteins important for cell proliferation and oncogenesis. In addition, up-regulation of the eIF3f subunit, which has been appointed as an important tumor suppressor in several cancer cell lines, may also contribute to attenuate cell proliferation.

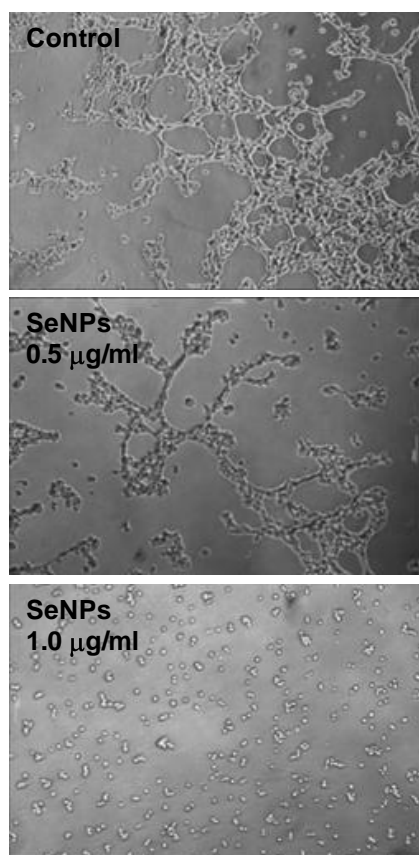


Figure 7. The invasive behavior of HepG2 cells in a matrigel decrease in the presence of SeNPs. Cells exposed to 0.5 $\mu\text{g/mL}$ SeNPs formed a less branched culture as compared to control cells. The morphology of cells exposed to 1.0 $\mu\text{g/mL}$ SeNPs was very different from control cells, appearing round and individuals with no ramifications.

Additional proteins and mechanisms affected by SeNPs exposure. In addition to some of the subunits of the eIF3 protein complex, we found other proteins altered in our SILAC approach upon SeNPs exposure, that could also help to better understand the mechanisms involved in the cell interaction with SeNPs.

One of the proteins that showed a higher up-regulation after SeNPs exposure was the VAPA (VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A) protein. VAPs proteins are endoplasmic reticulum (ER)-resident membrane proteins that are broadly expressed in eukaryotic cells and are involved in stress signaling, membrane trafficking and ER homeostasis.⁵⁹ Since VAP proteins are considered docking sites for cytoplasmatic factors to interact with the ER, the over-expression of VAPA may be directly related to the presence of SeNPs in this organelle (Figure 2D).^{60,61} VAPA is related to the lateral diffusion inhibition of membrane proteins, and also is associated with intracellular vesicles so that the massive vacuolization found in SeNPs-exposed cells (Figure 2F) could be induced by VAPA up-regulation.^{62,63} It has been reported that the over expression of the VAP A isoform (VAPA) but not the B isoform (VAPB), inhibited ER-to-Golgi transport of membrane proteins.⁶² Interestingly, we found VAPB slightly down-regulated suggesting that this protein may also be involved in the pathway through which SeNPs inhibited protein synthesis.

Heat shock proteins (HSPs) constitute a group of chaperone proteins that play a pivotal role in the maintenance of protein homeostasis. In our SILAC approach, the expression of heat shock 70 kDa protein 1A (HSPA1A/HSPA1B) was highly up-regulated upon SeNPs exposure. This result is in agreement with previous studies in which HSP70 was dramatically up-regulated under environmental stress.^{64,65} It has been also observed that the high expression of intracellular HSP70 may constitute a protective role against oxidative stress.^{66,67} Cell division cycle 37 homolog (CDC37), a positive regulator of stability and/or activity of some protein kinases, appeared up-regulated in our experiment.⁶⁸ This protein is involved in SAPK regulation, a stress-activated protein kinase dedicated to transmit environmental stress stimuli which has a crucial role in cellular survival under stress conditions and inflammatory responses.⁶⁹ It

is also worth mentioning that mammalian SAPK is related with the response of cancer cells to cytotoxic treatments.^{70,71}

It is known that during the development of tumor cells, the expression of many proteins and transcriptional regulators change.^{72,73} Because of this, the expression levels of these genes frequently have an important role as markers of cell invasion. Cytoplasmic FMR1 interacting protein 1 (Cyfip1) has been defined as a potential tumor suppressor that regulates invasive behavior. The loss of CYFIP1 expression is correlated with tumor progression in epithelial and colon cancers.⁷⁴ Interestingly, we found this protein over-expressed after SeNPsexposure, thus showing the capability of SeNPs to raise the expression levels of certain tumor suppressors, such as in the case of the eIF3f subunit previously shown.

The apoptosis-inducing factor mitochondrion-associated 1 (AIFM1) is required to maintain and organize the mitochondrial respiratory complex, acting as an NADH oxidase. It is also involved in programmed cell death and induction of apoptosis results in the translocation of this protein to the nucleus where it affects chromosome condensation and fragmentation.⁷⁵ In addition, AIFM1 is a mitochondrial protein which induces the mitochondria to release cytochrome c and caspase-9, two apoptogenic proteins; thus, down-regulation of this protein may be associated with a low percentage of apoptosis.⁷⁶ This facts are consistent with our results since AIF1 appeared down-regulated after SeNPs and no apoptosis was observed in our previous experiments (Figure 3A).

CONCLUSION

To the best of our knowledge, this is the first time that a quantitative proteomic approach has been used to unravel the molecular mechanisms responsible for the cell cycle arrest induced by SeNPs exposure. Our data, strongly suggest that the cell cycle is arrested in the G1/S transition by alteration of the levels of expression of the eIF3 protein complex, which inhibit the protein synthesis machinery. We have shown by different independent approaches how different eIF3 subunits, which are commonly found up-regulated in several types of tumors, are down-regulated after SeNPs exposure, except for eIF3f, which is the only eIF3 subunit that has been proposed as tumor suppressor. In addition, we have demonstrated the ability of SeNPs to inhibit *in vitro* cell invasion and the de-regulation of other proteins that could also be involved in

the overall inhibition of cell proliferation induced by SeNPs. These findings support the potential of SeNPs as a promising chemotherapeutic agent.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of SeNPs. The preparation of SeNPs was performed according to the procedure described by Bai *et al.*¹⁶ Briefly, 20 mL of an aqueous chitosan polysaccharide solution (20 mL, 0.5% w/v) was mixed with 15 mL of 0.23 M ascorbic acid and 10 mL of 2.4 M acetic acid; then, 0.5 mL of 0.51 M sodium selenite was slowly added into the mixture. The formation of SeNPs was visually assessed by the observation of a change from colorless to bright red in the reaction mixture. Finally, the dispersion was diluted to 100 mL with distilled water obtaining a final concentration of 200 µg/L of SeNPs. Synthesized SeNPs were stored at 4°C up to two months.

Cell Culture and Treatment. Human hepatocarcinoma (HepG2) and human epithelial cervix carcinoma (HeLa) cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with fetal bovine serum (10% v/v) and antibiotics (penicillin, 50 U/mL; streptomycin, 50 U/mL) in 5% CO₂ at 37 °C. SeNPs of 50-60 nm diameter were added at different concentrations ranging from 0.1 to 20 µg/mL and incubated for either 24 or 48 hours. Cells were then washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and harvested using 0.25% trypsin/0.1% EDTA (Sigma, USA).

Transmission Electron Microscopy Analysis. For characterization of the synthesized SeNPs, droplets of the dispersion were placed onto a holey carbon film on copper grids. Micrographs were obtained using the JEOL 1010 JEM transmission electron microscope (JEOL) operating at 100 kV. Internalization of the NPs in HepG2 cells was observed after treatment with 1 µg/mL SeNPs for 48 h. Following exposure, attached cells were washed with PBS and fixed *in situ* with glutaraldehyde (2.5% v/v) and *p*-formaldehyde (4% v/v) in PBS at 4 °C for 4 h. Cells were then washed and stored in PBS at 4°C overnight. After post-fixation with osmium tetroxide (1% v/v) for 1 h at room temperature and in the dark, the cells were dehydrated in graded ethanol series (from 30% to 100% ethanol) and harvested with propylene oxide. Cell suspensions were centrifuged at 1500 rpm for 30 seconds and the propylene oxide was removed. The pellets were treated with a mixture of resin:acetone and finally, treated with 100% resin.

The resulting blocks were incubated at 65 °C for 48 h until complete embedding. Ultrathin sections were cut, transferred onto coppergrids and examined by TEM.

Cell Viability Assay. Cells were seeded in a 96-well plate at a concentration of 5×10^4 cells per well and incubated in complete DMEM for 24 h at 37°C and 5% CO₂. Cells were treated with either SeNPs (0.1, 0.5, 1, 10 and 20 µg/mL) or with SeNPs synthesis media during 24 or 48 hours. Cell viability for each condition was measured by the MTT assay. Briefly, 20 µL of 5 mg/mL MTT solution were added to each well and incubated for 4 h at 37°C. Then, the media was removed and 100 µL of dimethyl sulfoxide was added. Absorbance was measured at 595 nm in a Sunrise microplate reader (Tecan).

Determination of Se by ICP-MS. Selenium was quantified in HepG2 cells exposed to 1 µg/mL SeNPs for 48 hours. After treatment, the exposure culture media, the PBS used for washing the cells and the cell pellet were digested in a microwave oven (CEM) with a mixture of HNO₃ (65%) and H₂O₂ (35%) (2:1). Digested samples were appropriately diluted with distilled water and then analyzed in an Agilent HP 7700x inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICP-MS) (Agilent). Total Se was measured using a reaction collision cell, which allows the reduction of important spectral interferences. In this case, the use of a 6 mL/min flow of H₂ provided negligible interference backgrounds for Se isotopes, ⁷⁶Se and ⁷⁸Se, which were quantified by external calibration.

Flow Cytometry Analysis. Measurement of apoptosis in SeNPs treated cells was performed using an Annexin V-FITC kit (Sigma) following the manufacturer's instructions. Around 1×10^6 cells were treated with 1 µg/mL SeNPs for 48 hours. Then, cells were washed with PBS and re-suspended in 1 mL binding buffer solution at pH 7.5 containing HEPES/NaOH (100 mM), NaCl (1.4 M) and CaCl₂ (25 mM). Annexin V-FITC conjugate (5 µL) and propidium iodide (10 µL) were added to 500 µL of the cell suspension in order to label the apoptotic and necrotic cells, respectively. Cells were incubated in the dark at room temperature, and immediately examined using a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson). For evaluating the cell cycle arrest after treatment with SeNPs, 1×10^6 HepG2 cells were re-suspended in 250 µL of PBS and mixed with an equal volume of a solution containing 60% ethanol (v/v) and 20 µg/mL of Hoechst

33258 reagent. Cells were incubated for at least 45 min at room temperature and the DNA content analyzed by flow cytometry. Collected data were analyzed using the MultiCycle AV (Phoenix Flow Systems) software.

Immunofluorescence Assay. Cells were seeded onto cover slips and incubated with 1 $\mu\text{g/mL}$ SeNPs for 48 h. The cells were washed with PBS, fixed with paraformaldehyde (4% v/v) in PBS for 10 min, permeabilized with Triton-X100 (0.1% v/v) in PBS for 15 min, and washed with PBS. The cells were blocked with bovine serum albumin (BSA, 2% w/v) in PBS for 1 h, followed by incubation with the primary antibody anti-eIF3a (1:100) (Bethyl) or anti-eIF3b (1:100) (BioLegends) for 40 min at room temperature on humid chamber. After three washings with PBS, cells were incubated with Alexa Fluor 586-labeled anti-rabbit IgG (1:1000) (Invitrogen) for 30 minutes at room temperature. Cells were incubated with Alexa Fluor 488-labeled phalloidine (1:60) (Invitrogen) for 20 min at room temperature. Finally, VectaShield (Atom) was used for staining the nuclei with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) and as a mounting media. Fluorescence microscopy was performed in a Motic AE31 epifluorescence microscope (Motic).

eIF3 Gene Knockdown. Human epithelial cervix carcinoma HeLa cells were seeded at 5×10^4 cells/well in 24-well plates and transfected with either eIF3 (30 pmol) or scrambled control siRNA (30 pmol) (Santa Cruz) using lipofectamine (Sigma) (1 mL) as transfection reagent and reduced serum media (opti-MEM) as transfection media. Cells were incubated in the transfection media for 5 h. The transfection was stopped by adding complete DMEM 10% FBS. After incubation for 24 h at 37°C 5% CO₂, the cells were harvested for further analyses.

Western Blotting. Whole total lysates were separated by SDS-PAGE and transferred to NC membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked in TBS-tween buffer (TBST, 0.05% v/v) containing 3% skim milk and incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibodies to the following: eukaryotic initiation factor 3 subunit b (eIF3/p116), 1:1000 (Biolegend), methyl tetrahydrofolate reductase 1 (MTHF1), 1:1000 (Santa Cruz). After washing with TBST, membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz) for 1 h at room temperature,

and specific proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

Matrigel Invasion Assay. Invasion assay was performed using Matrigel in 24-well plates, as per manufacturer's instructions. Briefly, Matrigel was mixed with culture media (1:1) and 200 μ L of the mixture was placed in each well and polymerized for 30 min at 37°C. A suspension of 5×10^4 cells previously exposed to SeNPs (0.5 and 1 μ g/mL for 48h) was added to the bottom of the well. Invasion of HepG2 cells was observed after incubation at 37°C for 5 h by phase-contrast microscopy (Motic).

Metabolic Labeling and Exposure to SeNPs. HepG2 cells were grown in either 'light' ($^{12}\text{C}_6$ -Lys and $^{12}\text{C}_6$ -Arg) or 'heavy' ($^{13}\text{C}_6$ -Lys and $^{13}\text{C}_6$ -Arg) DMEM medium (Dundee) containing 10% dialyzed FBS and 100 units/mL of penicillin/streptomycin. Culture media was refreshed every 2 days. Cells were grown for at least six doublings to allow full incorporation of labeled amino acids. Two large-scale SILAC replicates (10^7 cells per condition) were performed. Complete incorporation of $^{13}\text{C}_6$ -Lys and $^{13}\text{C}_6$ -Arg after six cell divisions in isotopically heavy medium was verified by MS of a protein digest. Cells labeled with "heavy" (direct SILAC) or "light" (reversed SILAC) amino acids were exposed to 1 μ g/mL SeNPs for 48 hours. Cells grown with "heavy" and "light" medium were mixed in a 1:1 ratio before subsequent processing. Cells were lysed in a buffer containing 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8, 0.2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2 mM Na_3VO_4 , 2 mM NaF, and protease inhibitors (Complete tablet; Roche).

SDS-PAGE and In-Gel Digestion. Proteins were separated by SDS-PAGE on 10% SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis, the proteins were visualized by Coomassie blue staining and the gel lanes were cut horizontally into 20 sections. Excised gel bands were de-stained in 25 mM ammonium bicarbonate/acetonitrile (1:1). De-stained bands were cut into small pieces, dehydrated with acetonitrile and dried. Gel pieces were rehydrated with 40 μ L of 12.5 mg/mL trypsin solution in 25 mM ammonium bicarbonate and incubated overnight at 37 °C. Peptides were extracted using acetonitrile and 5% formic acid, dried by vacuum centrifugation and re-suspended in 15 μ L of 0.1 % formic acid in 2% acetonitrile. All samples were sonicated for 10 min and centrifuged before MS analysis.

Nanoflow LC-MS/MS. The peptide mixtures from the different in-gel tryptic digestion fractions were loaded onto a trap column (Reprosil C18, 3 μm particle size, 0.3 x 10 mm, 120 Å pore size, SGE) and then eluted to the analytical column (Acclaim PepMap 100, C18, 3 μm particle size, 75 μm x 150 mm, 100 Å pore size, Dionex, LC Packings) with a linear gradient of 5-95% ACN in 0.1% formic acid. The samples were delivered over 120 min by a nano-LC ultra 1D plus system (Eksigent) at a flow-rate of 200 nL/min, through the analytical column to a stainless steel nano-bore emitter (O.D. 150 μm , I.D. 30 μm Proxeon, Odense, Denmark). The peptides were scanned and fragmented with an LTQ XL linear ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA) operated in data-dependent ZoomScan and MS/MS switching mode using the three most intense precursors detected in a survey scan from 400 to 1600 u (three μscans). ZoomScan mass window was set to 12 Da enabling monitoring of the entire $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ isotopic envelope of most doubly and triply charged peptides. Singly charged ions were excluded for MS/MS analysis. Normalized collision energy was set to 35% and dynamic exclusion was applied during 3 min periods to avoid repetitive fragmentation of ions.

Protein Identification and Quantification (Data processing). Generated raw files were converted to mgf files (Bioworks 3.3.1) for submission to the MASCOT database. A database containing the NCBI *Homo Sapiens* sequences (as of November 2012, 35586 sequences) was searched using the MASCOT protein identification software (v2.3 Matrix Science). Search criteria included trypsin specificity with one missed cleavage allowed, and with methionine oxidation, $^{13}\text{C}_6$ -Arg and $^{13}\text{C}_6$ -Lys as variable modifications. Minimum precursor and fragment-ion mass accuracies of 1.2 and 0.3 Da were used. To consider a protein as an accurate identification, at least one unique peptide (bold-red peptides meaning highest scoring peptide matching to protein with highest total score) with a Mascot score higher than 39 ($p < 0.05$) and a minimum total protein score of 46 ($p < 0.01$) were required. The false positive rate was calculated by searching the same spectra against the NCBI *Homo sapiens* decoy database. Relative quantification ratios of identified proteins based on peak area were calculated using Quixot v.1.3.26 open-source software (<http://150.244.205.155/mediawiki/index.php/QuiXot>). Protein ratios obtained by

Quixot were verified manually for all peptides. Functional processes and subcellular localization of the proteins identified by SILAC were assigned based on the biological knowledge available in Gene Ontology (GO) annotations. The Ingenuity Pathway (IPA) software was also used to provide insights into biological networks.

Conflict of Interest: The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgment.

This work was funded by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness CTQ2010-18644 and CTQ2011-28328C02-01. Authors thank the Comunidad Autónoma of Madrid (Spain) and European funding from FEDER programme (project S2009/AGR-1464, ANALISYC-II) and the Interreg European Project Orque-Sudoe. I. López acknowledges to Maria Luisa Garcia and Agustin Fernandez , from “Centro Nacional de Microscopia Electronica” for assistance in TEM observations, and “Centro de Asistencia a la Invesigación - Citometria de Flujo y Microscopía de Fluorescencia” for assistance in FC analyses.

REFERENCES

1. Fairweather-Tait, S. K.; Bao, Y.; Broadley, M. R.; Collings, R.; Ford, D.; Hesketh, J. E.; Hurst, R. Selenium in Human Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *14*, 1337-1383.
2. Sinha, R.; Ei-Bayoumy, K. Apoptosis is a Critical Cellular Event in Cancer Chemoprevention and Chemotherapy by Selenium Compounds. *Curr. Cancer Drug Targets* **2004**, *4*, 13-28.
3. Abdulah, R.; Miyazaki, K.; Nakazawa, M.; Koyama, H. Chemical Forms of Selenium for Cancer Prevention. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2005**, *19*, 141-50.
4. Wang, H.; Zhang, J.; Yu, H. Elemental Selenium at Nano Size Possesses Lower Toxicity without Compromising the Selenoenzymes: Comparison with Selenomethionine in Mice. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 1524–1533.

5. Zhang, J.; Wang, X.; Xu, T. Elemental Selenium at Nano Size (Nano-Se) as a Potential Chemopreventive Agent with Reduced Risk of Selenium Toxicity: Comparison with Se-Methylselenocysteine in Mice. *Toxicol. Sci.* **2008**, *101*, 22–31.
6. Jin-Song, Z.; Xue-Yun, G.; Li-De, Z.; Yong-Ping, B. Biological Effects of a Nano Red Elemental Selenium. *Biofactors* **2001**, *15*, 27-38.
7. Chen, T.; Wong, Y.S.; Zheng, W.; Bai, Y.; Huang, L. Selenium Nanoparticles Fabricated in UndariaPinnatifida Polysaccharide Solutions Induce Mitochondria-Mediated Apoptosis in A375 Human Melanoma Cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2008**, *67*, 26-31.
8. Luo, H.; Wang, F.; Bai Y.; Chen, T.; Zheng, W. Selenium Nanoparticles Inhibit the Growth of HeLa and MDA-MB-231 Cells Through Induction of S Phase Arrest. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2012**, *94*, 304-308.
9. Luque-Garcia, J. L.; Cabezas-Sanchez, P.; Camara, C. Proteomics as a Tool for Examining the Toxicity of Heavy Metals. *Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 703-716.
10. Luque-Garcia, J. L.; Sanchez-Diaz, R.; Lopez-Heras, I.; Martin, P.; Camara, C. Bioanalytical Strategies for In-Vitro and In-Vivo Evaluation of the Toxicity Induced by Metallic Nanoparticles. *Trends Anal. Chem.* **2013**, *43*, 254-268.
11. Ong, S. E.; Mann, M. A Practical Recipe for Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC). *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2650–2660.
12. Cuello, S.; Ramos, S.; Madrid, Y.; Luque-Garcia, J. L.; Camara, C. Differential Protein Expression of Hepatic Cells Associated with MeHg Exposure: Deepening Into the Molecular Mechanisms of Toxicity. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404*, 315-324.
13. Pi, P.; Jin, H.; Liu, R.; Song, B.; Wu, Q.; Liu, L.; Jiang, J.; Yang, F.; Cai, H.; Cai, J. Pathway of Cytotoxicity Induced by Folic Acid Modified Selenium Nanoparticles in MCF-7 Cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 1051–1062.
14. Zhang, Y.; Li X.; Huang, Z.; Zheng, W.; Fan, C.; Chen, T. Enhancement of Cell Permeabilization Apoptosis-Inducing Activity of Selenium Nanoparticles by ATP Surface Decoration. *Nanomedicine* **2013**, *9*, 74–84.
15. Ren, Y.; Zhao, T.; Mao, G.; Zhang, M.; Li, F.; Zou, Y.; Yang, L.; Wu, X. Antitumor Activity of Hyaluronic Acid-Selenium Nanoparticles in Heps Tumor Mice Models. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *57*, 57– 62.

16. Bai, Y.; Wang, Y.; Zhou, Y.; Li, W.; Zheng, W. Modification and modulation of saccharides on elemental selenium nanoparticles in liquid phase. *Materials Letters* **2008**, *62*, 2311-2314.
17. Luo, Y.; Zhang, B.; Cheng, W. H.; Wang, Q. Preparation, Characterization and Evaluation of Selenite-Loaded Chitosan/TPP Nanoparticles With or Without Zein Coating. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 942–951.
18. Zhang, S.; Luo, Y.; Zeng, H.; Wang, Q.; Tian, F.; Song, J.; Cheng, W. H. Encapsulation of Selenium in Chitosan Nanoparticles Improves Selenium Availability and Protects Cells from Selenium-Induced DNA Damage Response. *J. Nutr. Biochem.* **2011**, *22*, 1137–1142.
19. Saini, R. K.; Srivastava, A. K.; Gupta, P. K.; Das, K. pH Dependent Reversible Aggregation of Chitosan and Glyco-Chitosan Stabilized Silver Nanoparticles. *Chem. Phys. Lett.* **2011**, *511*, 326-330.
20. Lynch, I.; Salvati, A.; Dawson, K. A. Protein-Nanoparticle Interactions: What Does the Cell See? *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 546-547.
21. Kirchner, C.; Liedl, T.; Kudera, S.; Pellegrino, T.; Muñoz Javier, A.; Gaub, H. E.; Stölzle S.; Fertig, N.; Parak W. J. Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 331-338.
22. Limbach, L. K.; Li, Y.; Grass, R. N.; Brunner, T.J.; Hintermann, M. A.; Muller, M.; Gunther, D.; Stark. W. J. Oxide Nanoparticle Uptake in Human Lung Fibroblasts: Effects of Particle Size, Agglomeration, and Diffusion at Low Concentrations. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 9370-9376.
23. Jiang, X.; Tan, L.; Zhang, B.; Zhou, Y.; Yao, S.; Xie. Q. In Vitro Electrochemical Study on Combined Cytotoxicity of 5-Fluorouracil and Three Types of Nanoparticles Against MG-63 Cells. *Anal. Lett.* **2011**, *44*, 698-708.
24. Ngwa, H.A.; Kanthasamy, A.; Gu, Y.; Fang, N.; Anantharam, V.; Kanthasamy, A.G. Manganese Nanoparticle Activates Mitochondrial Dependent Apoptotic Signaling and Autophagy in Dopaminergic Neuronal Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2011**, *256*, 227-240.
25. Clift, M. J. D.; Rothen-Rutishauser, B.; Brown, D. M.; Duffin, R.; Donaldson, K.; Proudfoot, L.; Guy, K.; Stone, V. The Impact of Different Nanoparticle Surface Chemistry and Size on Uptake and Toxicity in a Murine Macrophage Cell Line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *232*, 418-427.

26. Zhang, M.; Li, J.; Xing, G.; He, R.; Li, W.; Song, Y.; Guo, H. Variation in the Internalization of Differently Sized Nanoparticles Induces Different DNA-Damaging Effects on a Macrophage Cell Line. *Arch. Toxicol.* **2011**, *85*, 1575-1588.
27. Marquis, B. J.; Love, S. A.; Braun, K. L.; Haynes, C. L. Analytical Methods to Assess Nanoparticle Toxicity. *Analyst* **2009**, *134*, 425-439.
28. Green, D. R.; Reed, J. C. Mitochondria and Apoptosis. *Science* **1998**, *281*, 1309-1312.
29. Li, N.; Sioutas, C.; Cho, A.; Schmitz, D.; Misra, C.; Sempf, J.; Wang, M.; Oberley, T.; Froines, J.; Nel, A. Ultrafine Particulate Pollutants Induce Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. *Environ. Health Perspect.* **2003**, *111*, 455-460.
30. Xia, T.; Kovoichich, M.; Brant, J.; Hotze, M.; Sempf, J.; Oberley, T.; Sioutas, C.; Yeh, J. I.; Wiesner, M. R.; Nel, A. E. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles to Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1794-1807.
31. Pan, Y.; Leifert, A.; Ruau, D.; Neuss, S.; Bornemann, J.; Schmid, G.; Brandau, W.; Simon, U.; Jahnke-Kühn, W. Gold Nanoparticles of Diameter 1.4 nm Trigger Necrosis by Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. *Small* **2009**, *5*, 2067-2076.
32. Chen, T.; Wong, Y. S.; Zheng, W.; Bai, Y.; Huang, L. Selenium Nanoparticles Fabricated in Undaria Pinnatifida Polysaccharide Solutions Induce Mitochondria-Mediated Apoptosis in A357 Human Melanoma Cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2008**, *67*, 26-31.
33. King, A.; Gottlieb, E.; Brooks, D. G.; Murphy, M. P.; Dunaief, J. L. Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species Mediate Blue Light-Induced Death of Retinal Pigment Epithelial Cells. *Photochem. Photobiol.* **2004**, *79*, 470-475.
34. Wang, X.; Wang, B.; Fan, Z.; Shi, X.; Ke, Z. J.; Luo, J. Thiamine Deficiency Induces Endoplasmic Reticulum Stress in Neurons *Neuroscience* **2007**, *144*, 1045-1056.
35. Sanges, D.; Marigo, V. Cross-Talk Between Two Apoptotic Pathways Activated by Endoplasmic Reticulum Stress: Differential Contribution of Caspase-12 and AIF. *Apoptosis* **2006**, *11*, 1629-1641.
36. Walter, L.; Hajnoczky, G. Mitochondria and Endoplasmic Reticulum: the Lethal Interorganellar Cross-Talk, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2005**, *37*, 191-206.

37. Huang, Y.; He, L.; Liu, W.; Fan, C.; Zheng, W.; Wong, Y.-S.; Chen, T. Selective Cellular Uptake and Induction of Apoptosis of Cancer-Targeted Selenium Nanoparticles. *Biomaterials***2013**, *34*, 7106-7116.
38. Harris, T.E.; Chi, A.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Rhoads, R. E.; Lawrence, J. C. Jr. mTOR-Dependent Stimulation of the Association of eIF4G and eIF3 by Insulin *EMBO J.***2006**, *25*, 1659-1668.
39. Siridechadilok, B.; Fraser, C. S., Hall, R., J.; Doudna, J. A.; Nogales, E. Structural Roles for Human Translation Factor eIF3 in Initiation of Protein Synthesis. *Science* **2005**, *310*, 1513-1515.
40. Zhou, C.; Arslan, F.; Wee, S.; Krishnan, S.; Ivanov, A. R.; Oliva, A.; Leatherwood, J.; Wolf, D. A. PCI Proteins eIF3e and eIF3m Define Distinct Translation Initiation Factor 3 Complexes. *BMC Biol.* **2005**, *3*, 14.
41. Goh, S. H.; Hong, S. H.; Lee, B. C.; Ju, M. H.; Jeong, J. S.; Cho, Y. R.; Kim, I. H.; Lee, Y. S. eIF3m Expression Influences the Regulation of Tumorigenesis-Related Genes in Human Colon Cancer. *Oncogene* **2011**, *30*, 398-409.
42. Pincheira, R.; Chen, Q.; Zhang, J. T. Identification of a 170-kDa Protein Over-Expressed in Lung Cancers. *Br. J. Cancer***2001**, *84*, 1520-1527.
43. Bachmann, F.; Banziger, R.; Burger, M. M. Cloning of a Novel Protein Overexpressed in Human Mammary Carcinoma. *Cancer Res.***1997**, *57*, 988-994.
44. Dellas, A.; Torhorst, J.; Bachmann, F.; Banziger, R.; Schultheiss, E.; Burger, M. M. Expression of p150 in Cervical Neoplasia and its Potential Value in Predicting Survival. *Cancer***1998**, *83*, 1376-1383.
45. Chen, G.; Burger, M. M. p150 Expression and its Prognostic Value in Squamous-Cell Carcinoma of the Esophagus. *Int. J. Cancer***1999**, *84*, 95-100.
46. Chen, G.; Burger, M. M. p150 Overexpression in Gastric Carcinoma: the Association with p53, Apoptosis and Cell Proliferation. *Int. J. Cancer***2004**, *112*, 393-398.
47. Olson, J. E.; Wang, X.; Goode, E. L.; Pankratz, V. S.; Fredericksen, Z. S.; Vierkant, R. A.; Pharoah, P. D.; Cerhan, J. R.; Couch, F. J. Variation in Genes Required for Normal Mitosis and Risk of Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2010**, *119*, 423-430.
48. Fraser, C. S.; Lee, J. Y.; Mayeur, G. L.; Bushell, M.; Doudna, J. A.; Hershey, J. W. The j-Subunit of Human Translation Initiation Factor eIF3 is Required for the

- Stable Binding of eIF3 and its Subcomplexes to 40S Ribosomal Subunits in Vitro. *J. Biol. Chem.***2004**, *279*, 8946–8956.
49. Zhou, M.; Sandercock, A. M.; Fraser, C. S.; Ridlova, G.; Stephens, E.; Schenauer, M. R. Mass Spectrometry Reveals Modularity and a Complete Subunit Interaction Map of the Eukaryotic Translation Factor eIF3. *Proc. Natl Acad. Sci. USA***2008**, *105*, 18139–18144.
50. Liang, H.; Ding, X.; Zhou, C.; Zhang, Y.; Xu, M.; Zhang, C.; Xu, L. Knockdown of Eukaryotic Translation Initiation Factors 3b (eIF3b) Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis in Glioblastoma Cells. *Neurol. Sci.* **2012**, *33*, 1057–1062.
51. Wang, Z.; Chen, J.; Sun, J.; Cui, Z.; Wu, H. RNA Interference-Mediated Silencing of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3, Subunit b (eIF3b) Gene Expression Inhibits Proliferation of Colon Cancer Cells. *World J. Surg. Oncol.***2012**, *10*, 119–127.
52. Shi, L.; Nishioka, W. K.; Th'ng, J.; Bradbury, E. M.; Litchfield, D. W.; Greenberg, A. H. Premature p34cdc2 Activation Required for Apoptosis. *Science***1994**, *263*, 1143–1145.
53. Beyaert, R.; Kidd, V. J.; Cornelis, S.; Van de Craen, M.; Denecker, G.; Lahti, J. M.; Gururajan, R.; Vandenabeele, P.; Fiers, W. Cleavage of PITSLRE Kinases by ICE/CASP-1 and CPP32/CASP-3 During Apoptosis Induced by Tumor Necrosis. *J. Biol. Chem.***1997**, *272*, 11694–11697.
54. Shi, J.; Kahle, A.; Hershey, J. W. B.; Honchak, B. M.; Warneke, J. A.; Leong, S. P. L.; Nelson, M. A. Decreased Expression of Eukaryotic Initiation Factor 3f Deregulates Translation and Apoptosis in Tumor Cells. *Oncogene***2006**, *25*, 4923–4936.
55. Hoffman, M. P.; Kibbey, M. C.; Letterio, J. J.; Kleinman, H. K. Role of Laminin-1 and TGF Beta-3 in Acinar Differentiation of a Human Submandibular Gland Cell Line (HSG). *J. Cell Sci.* **1996**, *109*, 2013–21.
56. Noel, S.; De Pauw-Gillet, M. C.; Purnell, G.; Nusgens, B.; Lapierre, C. M.; Foidart, J. M. Enhancement of Tumorigenicity of Human Breast Adenocarcinoma Cells in Nude Mice by Matrigel and Fibroblasts. *Br. J. Cancer***1993**, *68*, 909–15.
57. Auerbach, R.; Lewis, R.; Shinnars, B.; Kribai, L.; Akhtar, N. Angiogenesis Assays: a Critical Overview. *Clin. Chem.***2003**, *49*, 32–40.
58. Marques, M. M.; Martins, M. D.; Franca, C. M. Effect of Matrigel on Adenoid Cystic Carcinoma Cell Line Differentiation. *Int. J. Exp. Pathol.***2006**, *87*, 405–410.

59. Lev, S.; Ben Halevy, D.; Peretti, D.; Dahan, N. The VAP Protein Family: from Cellular Functions to Motor Neuron Disease. *Trends Cell Biol.***2008**, *18*, 282-290.
60. Skehel, P.; Fabian-Fine, R.; Kandel, E. Mouse VAP33 is Associated with the Endoplasmic Reticulum and Microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA***2000**, *97*, 1101-1106.
61. Soussan, L.; Burakov, D.; Daniels, M.; Tositer-Achituv, M.; Porat, A.; Yarden, Y.; Elazar, Z. ERG30, a VAP-33-Related Protein, Functions in Protein Transport Mediated. *J. Cell. Biol.***1999**, *146*, 301-311.
62. Prosser, D. C.; Tran, D.; Gougeon, P.Y.; Verly, C.; Ngsee, J.K. FFAT Rescues VAPA-Mediated Inhibition of ER-to-Golgi Transport and VAPB-Mediated ER Aggregation. *J. Cell. Biol.***2008**, *121*, 3052-3061.
63. Amarillo, R.; Ramachandran, S.; Sabanay, H.; Lev, S. Differential Regulation of Endoplasmic Reticulum Structure Through VAP-Nir Protein Interaction. *J. Biol. Chem.***2005**, *280*, 5934-5944.
64. De Maio, A. Heat Shock Proteins: Facts, Thoughts, and Dreams. *Shock* **1999**, *11*, 1-12.
65. Lindquist S.; Craig, E. A. The Heat-Shock Proteins. *Annu. Rev. Genet.***1988**, *22*, 631-677.
66. Welch, W. J. Mammalian Stress Response: Cell Physiology, Structure/Function of Stress Proteins, and Implications for Medicine and Disease. *Physiol. Rev.***1992**, *72*, 1063-1081.
67. Kiang, J. G.; Tsokos, G. C. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. *Pharmacol. Ther.***1998**, *80*, 183-201.
68. Hunter, T.; Poon, R. Y. C. Cdc37: A Protein Kinase Chaperone? *Trends Cell Biol.***1997**, *7*, 157-161.
69. Tatebe, H.; Shiozaki, K. Identification of Cdc37 as a Novel Regulator of the Stress-Responsive Mitogen-Activated Protein Kinase. *Mol. Cell. Biol.***2003**, *23*, 5132-5142.
70. Kyriakis, J. M.; Avruch J. Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiol. Rev.***2001**, *81*, 807-869.
71. Widmann, C.; Gibson, S.; Jarpe, M. B.; Johnson, G.L. Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module from Yeast to Human. *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, 143-180.

72. Zou, L.; Ding, Z.; Roy, P. Profilin-1 Overexpression Inhibits Proliferation of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Partly Through p27kip1 Upregulation. *J. Cell. Physiol.***2010**, *223*, 623-629.
73. Christofori G. New Signals from the Invasive Front. *Nature***2006**, *441*, 444-450.
74. Grunert S.; Jechlinger, M.; Beug, H. Diverse Cellular and Molecular Mechanisms Contribute to Epithelial Plasticity and Metastasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***2003**, *4*, 657-665.
75. Silva, J. M.; Ezhkova, E.; Silva, J.; Heart, S.; Castillo, M.; Campos, Y.; Castro, V.; Bonilla, F.; Cordon-Cardo, C.; Muthuswant, S.K.; Powers, S.; Fuchs, E. Hannon, G. J. Cyfip1 Is a Putative Invasion Suppressor in Epithelial Cancers. *Cell***2009**, *137*, 1047-1061.
76. Kim, H.D.; Youn, B.; Kim, T. S.; Kim, S. H.; Shin, H. S.; Kim, J. Regulators Affecting the Metastasis Suppressor Activity of Nm23-H1. *Mol. Cell Biochem.***2009**, *329*, 167-173.

IV.3. Posibilidades y Dificultades en el Análisis de Nanopartículas de TiO₂ en Productos Cosméticos y Alimenticios mediante Fraccionamiento en Flujo con Campo de Flujo Asimétrico Acoplado a Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo

“Prospects and Difficulties in TiO₂ Nanoparticles Analysis in Cosmetic and Food Products Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Hyphenated to an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”

Analytical Chemistry (*Enviado*)

Este trabajo se presentó en:

“XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica”. Úbeda, España, Junio 2013. Tipo de presentación: Póster

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Prospects and Difficulties in TiO₂ Nanoparticles Analysis in Cosmetic and Food Products Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Hyphenated to an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

Journal:	<i>Analytical Chemistry</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lopez, Isabel; Complutense University of Madrid, Analytical Chemistry Madrid, Yolanda; Complutense University, Analytical Chemistry Cámara, Carmen; Complutense University of Madrid, Analytical Chemistry

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **Prospects and Difficulties in TiO₂ Nanoparticles Analysis in Cosmetic and Food**
4 **Products Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Hyphenated to an**
5 **Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**
6
7
8

9
10 Isabel López-Heras, Yolanda Madrid*, and Carmen Cámara*

11
12 Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of
13 Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain
14

15
16
17 **ABSTRACT**
18

19
20 In this work, we proposed an analytical approach based on asymmetrical flow-field flow
21 fractionation combined to an inductively coupled plasma mass spectrometry (AF⁴-
22 ICPMS) for rutile TiO₂ NPs characterization and quantification in cosmetic and food
23 products. AF⁴-ICPMS separation of TiO₂ NPs was performed using 0.2% SDS, 6%
24 methanol at pH 8.7 as the carrier solution. Two problems were addressed during TiO₂
25 NPs analysis by AF⁴-ICPMS: size distribution determination and quantification of the
26 NPs. Two approaches were used for size determination: size calibration using
27 polystyrene latex standards of known sizes and transmission electron microscopy
28 (TEM). A method based on focused sonication for preparing NPs dispersions followed
29 by an online external calibration strategy based on AF⁴-ICPMS, using rutile TiO₂-NPs
30 as standards is presented here for first time. The developed method allowed suppressing
31 NPs-membrane non-specific interactions and overcome erroneous results when
32 quantifying by addition of ionic Ti solutions. The applicability of the quantification
33 method was tested on cosmetic products (moisturizing cream and makeup). Regarding
34 validation, at the 95% confidence level, no significant differences were detected
35 between titanium concentrations in the moisturizing cream prior sample mineralization
36 (3865 ± 139 mg Ti/kg sample), by FIA-ICPMS analysis prior NPs extraction (3770 ± 24
37 mg Ti/kg sample), and after using the optimized online calibration approach (3699 ±
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 145 mg Ti/kg sample). Besides the high Ti content found in the studied food products
4
5 (sugar glass and coffee cream), TiO₂ NPs were not detected.
6
7
8
9

10 INTRODUCTION

11
12 The presence of NMs is becoming common in a wide range of products and sectors
13 including medicine, cosmetics, clothing, engineering, electronics, and food. Titanium
14 dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) are frequently used as additives and glidants (“anti-
15 caking agents”) in the food industry, and are also included in sunscreens and cosmetics
16 products.¹⁻³ The TiO₂ NPs included in sunscreens act as a shield against UV radiation.
17
18 Many toxicological studies have been performed and several in vitro and in vivo
19 toxicity tests have showed that TiO₂ NPs do not penetrate the human skin.^{4,5} However,
20 there is some controversy on the mechanisms involved in TiO₂-induced genotoxicity
21 and carcinogenicity.⁶⁻⁸
22
23 Knowledge on size, shape, surface area, aggregation state, charge, chemistry, and
24 reactivity of NPs is essential when evaluating their potential toxicity and behavior. To
25 obtain correct information on the physical and chemical properties of NPs, reliable
26 quantitative methods of analysis are needed. A wide range of analytical techniques such
27 as microscopy, chromatography, centrifugation and filtration, spectroscopic, and other
28 related methods have been used for various purposes: characterization of particle size,
29 morphology and aggregation state,⁹ chemical characterization,¹⁰ and surface chemical
30 analysis.¹¹ Electron microscopy is highly demanded in NPs studies, since it allows
31 identifying the presence of these particles, providing useful information on size
32 distribution and other measurable properties.^{5,12} However, electron microscopy is not
33 always available and the average particle size depends on a limited number of measured
34 particles. Currently, field flow fractionation (FFF) is an emergent technique for size
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 separation of natural and inorganic NPs. The two mainly used FFF principles for TiO₂
4
5 NPs analysis are sedimentation (SedFFF) and the asymmetrical field-flow fractionation
6
7 (AF⁴).¹³⁻¹⁵ The UV detector is the most common system used in combination with FFF,
8
9 but this separation technique can be coupled to a range of sensitive and multi-element
10
11 detectors such as multi-angle laser light scattering (MALLS) and mass spectrometers
12
13 (ICPMS).¹⁶ The main advantage of FFF-ICPMS combination is not only the multiple
14
15 element detection capability, but also the higher sensitivity compared to UV detectors,
16
17 reaching detection limits in the range of ng/L.
18
19
20

21
22 Although AF⁴-ICPMS is considered a promising approach, AF⁴ has some poorly
23
24 understood instrumental limitations; undesirable losses of particles in the separation
25
26 channel, the need to re-equilibrate the membrane, or accumulation of NPs at the
27
28 membrane.¹⁷ Furthermore, development of analytical methodologies requires special
29
30 attention during sample preparation and optimization of the running conditions, which
31
32 have to be focused on certain type of particles and matrices.¹⁸
33
34
35

36
37 The aim of this work is to assess the possibilities and difficulties of AF⁴-ICPMS in
38
39 the characterization and quantification of TiO₂ NPs in cosmetic and food products
40
41 available in the market. The experimental parameters that affect NPs separation and
42
43 quantification by AF⁴-UV/ICPMS are here optimized and discussed. In addition, size
44
45 distribution results from AF⁴ were validated through transmission electron microscopy
46
47 (TEM). For the first time, a highly promising approach for quantitative determination of
48
49 TiO₂ NPs without the need of additional strategies and avoiding the use of calibration
50
51 standards of different nature is presented in this work.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and Samples

Standard TiO₂ NPs dispersions were prepared using rutile TiO₂ nanopowder (<100 nm particle size) (Sigma, St. Louis, USA). Ti elemental standard solution of 1000 mg/L (Merck, Darmstadt, Germany) was used to prepare ICPMS standard solutions. Sodium dodecyl sulfate (98.5%) (Sigma, St. Louis, USA) and methanol (HPLC grade) (Scharlau, Walkerburn, Scotland) were needed to prepare the carrier solution for the AF⁴ system. Sodium hydroxide (Panreac, Barcelona, Spain) was used to adjust the pH of the carrier solution to 8.7. Ultrapure Milli-Q water (Millipore, MA, USA) was used to prepare standard and carrier solutions. Polystyrene latex standards with diameters of 22, 54, and 100 nm (Postnova Analytik, Landsberg, Germany) were used for AF⁴ calibration. Nitric acid (HNO₃) (65%), hydrofluoric acid (HF) (47-51%) (Merck, Darmstadt, Germany), hydrogen peroxide (H₂O₂) (35%) and boric acid (H₃BO₃) (Panreac, Barcelona, Spain) were used to mineralize the samples. Hexane for defatting was purchased from Scharlau (Walkerburn, Scotland). The foodstuffs (sugar glass and coffee cream) and cosmetics (SPF 25-30 makeup and SPF 10 moisturizing cream) were purchased in the market.

Preparation of Standard TiO₂ NPs Dispersions

A standard dispersion of TiO₂ NPs at 1000 mg/L was prepared by dissolving the corresponding amount of rutile TiO₂ nanopowder in ultrapure water. To prevent particle aggregation the dispersion was sonicated in an ultrasonic bath for 10 min. For AF⁴ - ICPMS analysis, working standards dispersions were daily prepared by diluting the 1000 mg/L standard dispersion in the carrier solution and then tip sonicated for 2 min.

Instrumentation

An AF2000 asymmetrical flow field flow fractionation (AF⁴) system (Postnova Analytik, Landsberg, Germany), equipped with a regenerated cellulose membrane of 10 kDa molecular weight cut-off and a spacer of 350 μm , was used in this study. A 200 μL injection loop was used for sample injection into the AF⁴ system via a Rheodyne valvule. The AF⁴ channel was connected online to an Agilent Infinity 1260 UV detector (Agilent, CA, USA) and to a 7700x ICPMS instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), equipped with a cooled Scott-type spray chamber and a slurry nebulizer. Helium was used as collision gas (4.3 mL/min), and the isotopes ⁴⁷Ti, ⁴⁹Ti and ¹⁰³Rh were monitored. The optimized AF⁴ settings and flows used for separating the NPs are detailed in Table 1.

For FIA-ICPMS measurements, a PU-2089 LC pump (JASCO, Tokio, Japan), fitted with a six-port injection valve (Model 7725i, Rheodyne, Rohner Park, CA, USA) with a 100 μl injection loop and peek tube, was needed for offline ICPMS analysis. The outlet of the peek tube (inner diameter = 0.13 mm) was directly connected to the slurry nebulizer of the ICPMS system.

A 1000 W MSP microwave sample preparation system (CEM, Matthews, NC, USA) equipped with temperature and pressure feedback controls and 12 high-pressure vessels of 100 mL inner volume, operating at 1600 W, was employed for the digestion processes.

For stabilizing NPs dispersions, a Vibra cell VCx130 ultrasonic processor (Connecticut, USA) equipped with a titanium 2-mm-diameter microtip and fitted with a high-frequency generator of 130W at frequency of 20 KHz was used.

An Eppendorf Centrifuge 5804 R (Hamburg, Germany) was used to separate the hexane fraction from the solid residue after the extraction procedure.

1
2
3 An Eppendorf Vacufuge plus concentrator (Eppendorf AG, Hamburg) was used to
4 evaporate the liquid solvent after collecting the fraction from the AF⁴ system in order to
5 concentrate TiO₂ NPs for further analysis.
6
7

8
9
10 Transmission electron microscopy (TEM) analyses were performed using a JEM
11 2000FX microscope (JEOL, Tokio, Japan) at 200 kV.
12

13
14 For accurate characterization of TiO₂ NPs, fractions containing NPs were collected from
15 the AF⁴ system, concentrated, and analyzed by TEM. Samples were prepared by placing
16 droplets of dispersion onto a holey carbon film on copper grids.
17
18
19

20 21 22 **Microwave Acid Digestion of Cosmetic and Food Samples**

23
24 Approximately 0.1 g of sample was placed into a double-wallet advanced composite
25 vessel (ACV) for microwave-assisted digestion. The mineralization consisted of a two-
26 step process. First, 6 mL of HNO₃ (65%), 3 mL of concentrated HF (47-51%), and 1
27 mL of H₂O₂ (35%) and 1.5 g of H₃BO₃ were added to the sample. Then, the vessels
28 were sealed and subjected to microwave digestion. The digested extracts were
29 transferred to volumetric flasks and diluted to 100 mL with ultrapure water. All
30 digestions were performed in triplicate.
31
32
33

34 35 36 **TiO₂ NPs AF⁴-ICPMS Quantification in Extracts from Cosmetic Samples**

37
38 Two different quantification methods were applied to the TiO₂ NPs extracted by
39 applying the procedure of Nischwitz et al.¹⁵
40

41
42 *Online AF⁴-ICPMS calibration:* External calibration curve was prepared by using
43 rutile TiO₂ NPs as standard. Different concentrations were prepared by diluting a
44 standard dispersion of 1000 mg TiO₂/L in the appropriate volumes of the carrier
45 solution. Before injecting into the AF⁴-ICPMS system, the dispersions were sonicated
46 for 2 min using a tip sonicator.
47
48
49

50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60 *Offline AF⁴-ICPMS calibration:* Sample extracts were injected into the AF⁴ system

1
2
3 and the fractions corresponding to UV signal of NPs were collected from the
4
5 AF⁴ channel. Ti content in each fraction was quantified by FIA-ICPMS using a standard
6
7 addition method following two different approaches: a) by spiking several aliquots of
8
9 each fraction with increasing concentrations of Ti elemental standard solution, and b) by
10
11 spiking several aliquots of each fraction with increasing concentrations of rutile NPs
12
13 TiO₂ NP standard dispersion.
14
15

16
17 In both approaches a 50 µg/L of ¹⁰³Rh solution was used as the internal standard. Data
18
19 were obtained in Time Resolved Analysis (TRA) mode and signals were integrated as
20
21 peak area.
22
23
24
25
26

27 **RESULTS AND DISCUSSION**

28 29 **Optimization of the Parameters Affecting TiO₂ NPs Rutile Standard Separation** 30 31 **by AF⁴** 32

33
34 The separation of NPs by AF⁴ is directly affected by experimental and instrumental
35
36 parameters. Concerning this latter, the type of membrane and spacer dimensions
37
38 play an important role in NPs separations.^{14,19,20} In this work, regenerated cellulose
39
40 (RC) membrane and a 350 µm thick spacer were chosen.
41
42

43
44 Regarding carrier composition, parameters such as ionic strength, surfactant agent,
45
46 and the pH of the carrier solution can affect NP-NP interactions or NPs-membrane
47
48 interactions.^{17,21,22} It has been reported that at low ionic strength conditions TiO₂
49
50 aggregation decreases.¹⁴ Thus, preliminary experiments were carried out in presence of
51
52 0.03, 0.003, and 0.001 mol/L NaNO₃. The increase of the ionic strength led to
53
54 irreversibly adsorption of large particles onto the membrane (data not shown), and
55
56 therefore losses in the channel and low recoveries, which was in line with results
57
58 obtained by other authors.²³ For these reasons, the use of electrolytes was discarded in
59
60

1
2
3 further experiments. Carriers with pH values between 7 - 9 are often used in AF⁴.²⁴
4
5 Hence, considering that TiO₂ NPs in rutile phase are stabilized in alkaline solution,²⁵
6
7 we decided to use a carrier solution at pH 8.7. We also observed that an improvement in
8
9 NPs separations was obtained through the AF⁴ system with the addition of SDS in the
10
11 carrier liquid in comparison with water. Three SDS concentrations (0.01, 0.1, and 0.2%
12
13 (w/v)) at basic pH were tested using different separation programs (by applying
14
15 different cross flow rates and elution modes). By using the lowest SDS concentration,
16
17 the most of the injected NPs eluted at 0 mL/min cross flow (A; Figure S-1, Supporting
18
19 Information). The increase of SDS concentration prevented non-specific NPs-membrane
20
21 interactions and provided a better rutile TiO₂ NPs standard fractionation. Marked
22
23 variations in UV profiles were obtained when the carrier solution contained 0.2% (w/v)
24
25 SDS (C; Figure S-1, Supporting Information). This concentration was used for
26
27 subsequent experiments. The use of organic solvents in the carrier solution may prevent
28
29 TiO₂ NPs aggregation, improving the resolution of the fractograms.^{15,26} This led us to
30
31 use a carrier solution with 0.2% SDS and 3% methanol at pH 8.7
32
33
34
35
36
37

38
39 Cross flow is one of the main parameters controlling the distribution of particles
40
41 through the membrane and consequently their separation.^{27,28} We optimized the cross
42
43 flow at a constant and gradient elution mode. At high cross flow rate (2 mL/min),
44
45 interaction of the NPs with the membrane increased and most of the sample eluted when
46
47 the cross flow was at 0 mL/min, as TiO₂ NPs that were non-specifically adsorbed to the
48
49 membrane were released when the cross flow was interrupted (A; Figure S-2,
50
51 Supporting Information). The tendency of TiO₂ NPs to form aggregates larger than 100
52
53 nm led us use cross flow rates below 2 mL/min. A cross flow of 1 mL/min did not
54
55 improve the fractionation since a high intensity peak at 0 mL/min cross flow was
56
57 observed (B; Figure S-2, Supporting Information). On the contrary, the behavior of the
58
59
60

1
2
3 rutile TiO₂ NPs standard using a cross flow of 0.5 mL/min and a linear decay of the
4
5 flow rate in 10 min was promising, but required further optimization (C.1; Figure S-2,
6
7 Supporting Information). Considering that the gradient time was not enough to achieve
8
9 a complete NPs recovery in the elution step, longer gradient times were tested (C.2,C.3;
10
11 Figure S-2, Supporting Information). By applying a 30 min gradient time, the peak
12
13 corresponding to residual NPs disappeared and the NPs eluted within a range of 15-32
14
15 min (C.3; Figure S-2, Supporting Information). Thus, a 0.5 mL/min rate was chosen as
16
17 the optimal cross flow, which was in line with the value reported by other authors.²⁷
18
19
20
21
22
23

24 **Recovery and Reproducibility Problems of AF⁴ Rutile TiO₂ NPs Fractionation**

25
26 Low recovery values could be attributed to undesirable membrane-particle interactions
27
28 or insufficient fractionation. Adsorbed NPs can modify the membrane surface charge,
29
30 preventing further adsorption.¹⁶ In our study, about 5 consecutive injections to stabilize
31
32 the membrane before sample fractionation were enough.
33
34

35
36 The ratio of peak areas of the fractograms and the amount of sample injected was used
37
38 as a first assessment of recovery. Initially, we had serious problems in terms of
39
40 reproducibility and recovery (A; Figure S-3, Supporting Information). The effect of
41
42 methanol concentration change from 3% to 6% to avoid sample loss and/or adhesion of
43
44 NPs to surfaces of the devices, including the bottom membrane, was checked. Results
45
46 showed that when 6% methanol was used the ratio of peak areas were proportional to
47
48 the ratio of the amount of TiO₂ NPs injected (about r=2) (B; Figure S-3, Supporting
49
50 Information). Considering this, we concluded that a 0.2% (w/v) SDS and 6% (v/v)
51
52 methanol at pH 8.7 was the optimal composition for the carrier solution.
53
54
55
56
57
58
59
60

AF⁴-ICPMS Fractionation of the Rutile TiO₂ NPs .Confirmation of Size Distribution by Transmission Electron Microscopy

Using the previously optimized conditions, two peaks were obtained in the fractograms after the injection of the rutile TiO₂ NPs dispersion and UV/ICPMS detection (black line, Figure 1A). The first peak appeared at 5 - 6.5 min and could correspond on one hand to a residue of the void peak or to a memory effect due to the deposition of NPs in the focus zone, and on the other hand to low size NPs present in the dispersion. The second peak appeared at 12 - 32 min, it was quite broad and could correspond to highly aggregated TiO₂ NPs.^{13,14,15} To date, obtaining adequate information on NPs sizes is still an important issue in AF⁴ analyses.^{17,29}

We constructed a size calibration using polystyrene latex standards of three known sizes (22, 54, and 100 nm) (gray line, Figure 1A). By assuming that the elution behavior of TiO₂ NPs and the latex standards are similar, we estimated that the particles identified in the first peak had a hydrodynamic diameter below 22 nm, whereas aggregated particles (higher than 100 nm in size), showing a wide dispersion, eluted at 12 - 32 min. Sometimes, elution times cannot be associated with the real size of the NPs, e.g., when NPs are aggregated or when other components of the sample interact with the membrane, slowing down or accelerating the elution time of the particles.

Besides latex calibration standards, electron microscopy was used to determine the primary particle size and morphology of dry NPs. Fractions corresponding to Peak 1 and Peak 2 were collected and evaporated prior TEM analysis. Comparison of both methods, particle size obtained by TEM with the average size calculated using latex standards, showed the following: TEM images corresponding to the narrow Peak 1 revealed the presence of TiO₂ aggregates of lower size (Figure 1B). However, NPs size of around 80 nm indicated that the elution time did not correspond to the expected size.

1
2
3 These results reveal that NPs that eluted earlier, identified in the void peak, correspond
4 to NPS with a smaller size in comparison with those that eluted later. Aggregates of
5
6 around 200 nm (TEM) fit with the broad size distribution (second peak) observed in
7
8 AF⁴-ICPMS (Figure 1C). Furthermore, an organic substance on the surface of the
9
10 aggregates was observed, suggesting SDS may adsorb on the surface of the particles,
11
12 preventing them from interacting.^{30,31} It is important to remark that TEM images
13
14 obtained from Peak 2 revealed aggregates larger than 200 nm in size, reaching 1 μm
15
16 approximately (Figure 1D). These findings could indicate the incompatibility between
17
18 the latex standards used in many size calibration approaches and the rutile TiO₂ NPs
19
20 standard. One explanation for the obtained profile (fractogram) could be the lack of
21
22 spherical TiO₂ NPs and their high aggregation state.³²
23
24
25
26
27
28

29 **Effect of Ultrasound Energy on AF⁴ Recovery**

30
31 Preparation of NPs dispersions for AF⁴ analysis is a critical step, since solvent
32
33 changes, pH, or even dilutions may affect their agglomeration and behavior. Although
34
35 TiO₂ NPs are not able to separate (themselves) into individual particles regardless the
36
37 sonication procedure used,³² it has been shown that ultrasound energy slightly reduces
38
39 agglomeration leading to a minimal effect on particle surface charge. In this study, the
40
41 effect of the type of ultrasound (ultrasonic bath vs ultrasonic probe) on aggregation and
42
43 the sonication time were optimized. The fractogram profiles obtained with both
44
45 sonication techniques were quite similar but recovery using the ultrasonic probe (at 40%
46
47 ultrasound amplitude for 2 min) increased in comparison to the ultrasonic bath (Figure
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
2).

AF⁴-ICPMS Quantification of TiO₂ NPs: Development of an External Calibration

Approach

Possible differences in ionization and transport efficiencies between NPs and their corresponding ionic species in the mass spectrometer may be a critical question to achieve a correct quantification. Here, we have developed an external calibration approach using the rutile TiO₂ NPs standard. It was observed that the construction of external calibration graphs was complicated due to its aggregation-dependant response. External standard calibrations curves were generated after the injection of a series of rutile TiO₂ NPs dispersions into the AF⁴ system combined with ICPMS. Standard dispersions were previously stabilized by placing them in an ultrasonic bath for 10 min or in an ultrasonic probe for 2 min. The fractograms did not reveal a proportional increase of Ti⁴⁹ signal intensity (integrated as peak area) in a concentration-dependent manner when the ultrasonic bath was used (Figure 3A). On the contrary, when focused energy was applied, good reproducibility of fractograms, in terms of peak shape and maximum elution times, was achieved (Figure 3B). The response obtained in a preliminary calibration approach (using ultrasonic bath sonication) was not linear (Figure 3C); however, a successful linear plot ($R^2=0.9964$ and $R^2=0.9952$ for Peak 1 and Peak 2, respectively) and slopes with similar sensitivity were obtained in a second approach (Figure 3D). These findings prove that tip sonication is more appropriated than conventional baths for further quantification of TiO₂ NPs. The adding up of Peak 1 and Peak 2 areas presumably corresponds to the whole injected NPs standard. Since areas ratio between Peak 2 and Peak 1 were similar in each calibration point, it was concluded that the amount of rutile TiO₂ NPs eluted at 5 min represents 14% of the total mass, whereas the remaining titanium, corresponding to 86%, eluted at 17 - 32 min. In order to verify these results, fractions from Peak 1 and Peak 2 were collected,

1
2
3 evaporated, and subjected to acid digestion. The Ti content was determined by ICPMS
4
5 and the values obtained were the same as the percentages calculated theoretically (12.5
6
7 $\pm 0.2\%$ and $87.4 \pm 0.6\%$ for peak 1 and peak 2, respectively). We believe our results are
8
9 very promising. A suitable online calibration strategy using rutile TiO_2 NPs standards
10
11 could be of great help for the correct quantification of the TiO_2 NPs present in samples,
12
13 minimizing the risks of getting erroneous information, and without the need of
14
15 additional strategies.
16
17
18
19
20
21

22 **AF⁴-ICPMS Detection and Quantification of TiO_2 NPs in Cosmetic and Food** 23 24 **Products**

25
26
27 Total titanium content in cosmetic and food products were determined by ICPMS
28
29 following the procedures specified in the Experimental Section. The concentration of Ti
30
31 found in food and cosmetic products are shown in Table 2 (column 2).
32

33
34 Next, TiO_2 NPs from samples were extracted following the conditions previously
35
36 optimized by Nischwitz et al.¹⁵ Extraction efficiency was established by comparing the
37
38 amount of titanium obtained by acid digestion and extraction protocol. One difficulty
39
40 found when analyzing NPs by ICP-based techniques was the differences in nebulization
41
42 efficiencies between NPs and the ionic standard solutions. With the aim of evaluating
43
44 the extent of this effect, two external calibration approaches based on registering the
45
46 areas of the peaks obtained by FIA-ICPMS with rutile TiO_2 NPs (Method 1) and ionic
47
48 Ti (Method 2) were performed. The sensitivity of Method 2 was almost three times
49
50 higher than for the Method 1. This fact corroborated the differences in the efficiency of
51
52 nebulization for both species. The Ti concentrations found in the aqueous extracts of the
53
54 moisturizing cream using Method 1 (Table 2, column 3) was very similar to the Ti
55
56 concentrations previously quantified after acid digestion (Table 2, column 2). These
57
58
59
60

1
2
3 results prove that the Ti in the sample is present as TiO₂ NPs (3770 ± 24 mg Ti/kg
4 sample). However, the concentration of NPs in the makeup extracts was lower than the
5 Ti concentration found in the samples after their mineralization. This could indicate: 1)
6 that only 54% of the Ti content is present as TiO₂ NPs (29581 ± 1629 mg Ti/kg
7 sample), and/or 2) a low extraction efficiency due to the presence of organic compounds
8 and other matrix interferences.
9

10
11 Finally, food samples were treated under similar conditions, but a negligible Ti
12 signal was detected, probably because TiO₂ particles were larger than 1 μm. Particles of
13 this size cannot be analyzed by AF⁴ and other techniques such as filtration,
14 ultracentrifugation and sedimentation should be used.³³ TEM analysis did not reveal
15 presence of TiO₂ in the food extracts, which could be due to the poor sensitivity of this
16 technique for the Ti levels found in these matrices.
17

18
19 Fractograms of makeup and moisturizing cream extracts showed different particle
20 size distribution patterns (Figure 4). The NPs present in the makeup samples (with
21 higher SDF value) had a large particle size than those found in the moisturizing cream
22 (with lower SPF value), which is in line with the results published elsewhere.¹³
23 Differences in elution times may be attributed either to the presence of organic
24 components or due to the original size of the added NPs. Recovery percentages were
25 calculated by comparing the Ti concentration in the mineralized moisturizing cream
26 sample (SPF 15) with Ti concentration in the mineralized fraction collected from the
27 AF⁴ system (8 - 22 min). An average recovery of 85±4 % was obtained, below 100%
28 because the first fraction (5 - 6.5 min) was not collected. However, the recovery of NPs
29 from the makeup samples (SPF 25-30) was very poor (30%), probably due to either the
30 complexity of the matrix, or the loss of particles in the AF⁴ channel as soluble Ti, and/or
31 adsorption to the membrane.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

TiO₂ NPs Quantification by Offline and Online AF⁴-ICPMS Calibration Approach

Development of calibration methods based on the use of standards with similar properties to that of the NPs present in the samples is of great importance for AF⁴-ICPMS analysis. NPs content in the moisturizing cream was calculated using the linear regression equation generated from the calibration method using the rutile TiO₂ NPs standard. An average concentration of 3699 ± 145 mgTi/kg sample was determined (Table 2, column 5). This concentration was similar to the amount of NPs quantified by FIA-ICPMS analysis and after sample mineralization. Two different calibration approaches, using offline AF⁴-ICPMS quantifications were evaluated in order to test the success of the external calibration method proposed in this work.

For offline quantifications, NPs fractions were collected from the AF⁴ system. Several aliquots were then spiked with increasing amounts of Ti standards (in form of rutile TiO₂ NPs or ionic Ti) into a FIA-ICPMS system. Variations in TiO₂ NPs contents in comparison to the results obtained using online calibration were observed (Table 2, column 6). Standard deviations in offline calibration strategies were higher than in online methods, particularly when the ionic Ti standard was added. The discrepancies in the concentrations calculated by offline and online calibration approaches indicates that the online external calibration method is more suitable for AF⁴-ICPMS quantification. This way, possible erroneous data due to differences in the efficiency of nebulization and sample handling can be prevented.

CONCLUSIONS

TiO₂ NPs were successfully characterized and quantified using a hyphenated instrumental platform consisting of AF⁴ with UV detection and combined with ICPMS. Besides the optimization of the cross flow rate and carrier composition, the ultrasound energy methodology used in NPs stabilization seems to be one of the main parameters controlling fractionation efficiency. The optimized experimental conditions provided a complete rutile TiO₂ NPs recovery from the AF⁴ system, avoiding drawbacks due to non-specific interactions with membrane and NPs losses. A method based on focused sonication for preparing NPs dispersion followed by an online external calibration strategy, using rutile TiO₂ NPs as standards, has been successfully applied. The developed online calibration method represents a promising approach for quantitative determination of TiO₂ NPs in consumer products without the need of additional strategies or the use of standard calibrates of different chemical nature. Electron microscopy of rutileTiO₂ NPs provides very useful information that can be compared with the characterization provided by AF⁴-ICPMS.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author:

*Fax +34 913944329. E-mail: ccamara@quim.ucm.es, ymadrid@quim.ucm.es

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Spanish Government for the financial support through the projects CTQ2011-28328-C02-01; ANALISYC II, P2009/AGR-1464, the European Interreg Project Orque-Sudoe and CTQ2011-22732 I. López acknowledges to “Centro Nacional de Microscopia Electronica” for assistance in TEM observations and the Regional Government of Madrid for financial support through the program “*Contrato de Personal de Investigación de Apoyo*” (Project S-0505/AGR/0312). The authors also thank to Postnova Analytical for its technical support.

REFERENCES

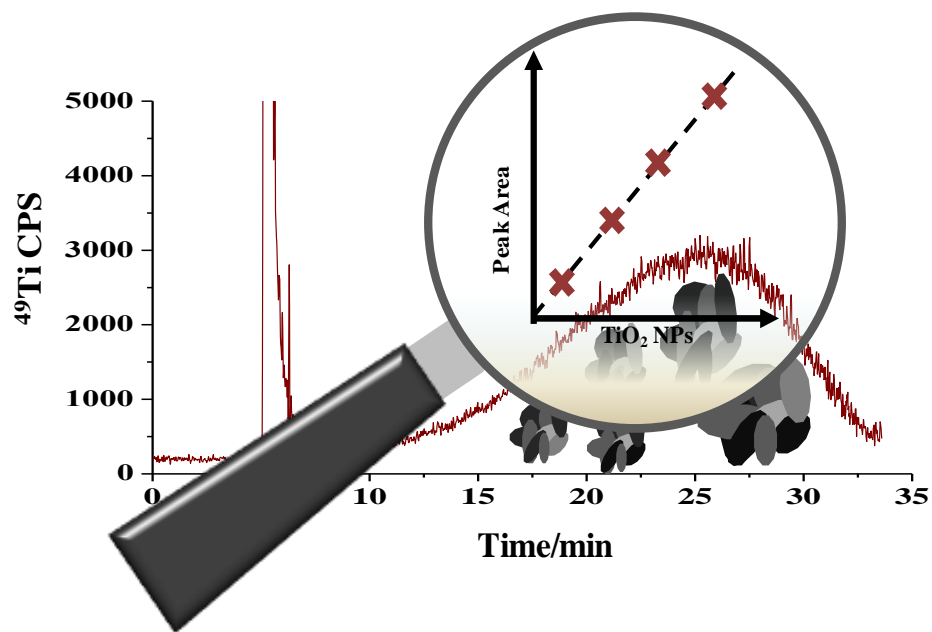
- (1) Chaudhry, Q.; Aitken R.; Scotter M.; Blackburn J.; Ross B.; Boxall A.; Castle L.; Watkins R. *Food Addit. Contam.* **2008**, *25*, 241-258.
- (2) Reijnders L. *Powder Technology* **2007**, *175*, 142–145.
- (3) Anderson M. W.; Hewitt J. P.; Spruce S. R. In Broad-spectrum physical sunscreens: titanium dioxide and zinc dioxide; Lowe N. J., Shaath N. A., Pathak M. A., Eds.; Marcel Dekker Inc: New York, **1997**; pp, 353–398.
- (4) Filipe P.; Silva J. N.; Silva R.; Cirne de Castro J. L.; Marques Gomes M.; Alves L. C.; Santus R.; Pinheiro T. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2009**, *22*, 266–275.
- (5) Sadrieh N.; Wokovich A. M.; Gopee N. V.; Zheng J.; Haines D.; Parmiter D.; Siitonen P. H.; Cozart C. R.; Patri A. K.; McNeil S. E.; Howard P. C.; Doub W. H.; Buhse L. F. *Toxicol. Sci.* **2010**, *115*, 156–166.
- (6) Grassian V. H.; Adamcakova-Dodd A.; Pettibone J. M.; O’Shaughnessy P.; Thorne P. S. *Nanotoxicology* **2007**, *1*, 211–226.
- (7) Sayes C. M.; Wahi R.; Kurian P. A.; Liu Y.; West J. L.; Ausman K. D.; Warheit D. B.; Colvin V. L. *Toxicol. Sci.* **2006**, *92*, 174–185.

- 1
2
3 (8) Sychevaa L. P.; Zhurkova V. S.; Iurchenko V. V.; Daugel-Daugeb N. O.;
4
5 Kovalenko M. A.; Krivtsova E. K.; Durnev A. D. *Mutation Research* **2011**, 726, 8–
6
7 14.
8
9
10 (9) Marquis B. J.; Love S. A.; Braun K. L.; Haynes C. L. *Analyst* **2009**, 134, 425-439.
11
12 (10) Hasselov M.; Readman J. W.; Ranville J. F.; Tiede K. *Ecotoxicology* **2008**, 17,
13
14 344-361.
15
16 (11) Nunome Y.; Morishita T.; Matsumoto K.; Kitagawa K. *Microchem. J.* **2010**, 96,
17
18 357-361.
19
20 (12) Chuklanov A. P.; Ziganshina S. A.; Bukharaev A. A. *Surf. Interface Anal.* **2006**,
21
22 38, 679-81.
23
24 (13) Samontha A.; Shiowatana J.; Siripinyanond A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399,
25
26 973–978.
27
28 (14) Contado C.; Pagnoni A. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 7594–7608.
29
30
31 (15) Nischwitz V.; Goenaga-Infante H. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, 27, 1084-1092.
32
33
34 (16) Schmidt B.; Loeschner K.; Hadrup N.; Mortensen A.; Sloth J. J.; Bender Koch C.;
35
36 Larsen E. H. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 2461–2468.
37
38
39 (17) Ulrich A.; Losert S.; Bendixen N.; Al-Kattan A.; Hagendorfer H.; Nowack B.;
40
41 Adlhart C.; Ebert J.; Lattuadae M.; Hungerbühler K. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, 27,
42
43 1120-1130.
44
45
46 (18) Von der Kammer F.; Ottofuelling S.; Hofmann T. *Environ. Pollut.* **2010**, 158,
47
48 3472-3481.
49
50
51 (19) Hagendorfer H.; Kaegic R.; Traberc J.; Mertensd S. F. L.; Scherrerse R.; Ludwigb
52
53 C.; Ulrich A. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 706, 367– 378.
54
55
56 (20) Alasonati E.; Dubascoux S.; Lespes G.; Slaveykova V .I. *Environ. Chem.* **2010**, 7,
57
58 215-221.
59
60

- 1
2
3 (21) Thang N. M.; Geckeis H.; Kim J. I.; Beck H. P. *Colloid Surf. A: Physicochem.*
4
5 *Eng. Aspects* **2001**, *181*, 289-301.
6
7
8 (22) Delay M.; Dolt T.; Woellhaf A.; Sembritzki R.; Frimmel F. H. *J. Chromatogr., A*
9
10 **2011**, *1218*, 4206– 4212.
11
12 (23) Bolea E.; Gorriz M. P.; Boubyb M.; Laborda F.; Castillo J. R.; Geckeis H. *J.*
13 *Chromatogr., A* **2006**, *1129*, 236–246.
14
15
16 (24) Rajh T.; Chen L. X.; Lucas L.; Liu T.; Thurnauer M. C.; Tiede D. M. *J. Phys.*
17 *Chem. B* **2002**, *106*, 10543-10552.
18
19
20 (25) Barnard A.; Saponjic Z.; Tiede D.; Rajh T.; Curtiss L. *Rev. Adv. Mater. Sci.* **2005**,
21 *10*, 21-27.
22
23
24 (26) Ismagilov Z. R.; Tsykoza L. T.; Shikina N. V.; Zarytova V. F.; Zinoviev V. V.;
25
26 Zagrebelnyi S. N. *Russian Chemical Reviews* **2009**, *78*, 873-885.
27
28
29 (27) Baalousha M.; Kammer F. V. D.; Motelica-Heino M.; Hilal H. S.; Le Coustumer P.
30
31 *J. Chromatogr., A* **2006**, *1104*, 272-281.
32
33
34 (28) Calzolari L.; Gilliland D.; Pascual García C.; Rossi F. *J. Chromatogr., A*, **2011**,
35 *1218*, 4234-4239.
36
37
38 (29) Hoque Md E.; Khosravi K.; Newman K.; Metcalfe C. D. *J. Chromatogr., A* **2012**,
39 *1233*, 109– 115.
40
41
42 (30) Powers K. W.; Brown S. C.; Krishna V. B.; Wasdo S. C.; Moudgil B. M.; Roberts
43 *S. M. Toxicol. Sci.* **2006**, *90*, 296-303.
44
45
46 (31) Lindman S.; Lynch I.; Thulin E.; Nilsson H.; Dawson K. A.; Linse S. *Nano Lett.*
47 **2007**, *7*, 914-920.
48
49
50 (32) Bihari P.; Vippola M.; Schultes S.; Praetner M.; Khandoga A. G.; Reichel C. A.;
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 (33) Krystek P.; Ulrich A.; Garcia C. C.; Manohard S.; Ritsema R. *Anal. At. Spectrom.*,
4
5
6 **2011**, 26, 1701-1721.
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract (ABS) Graphic



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1

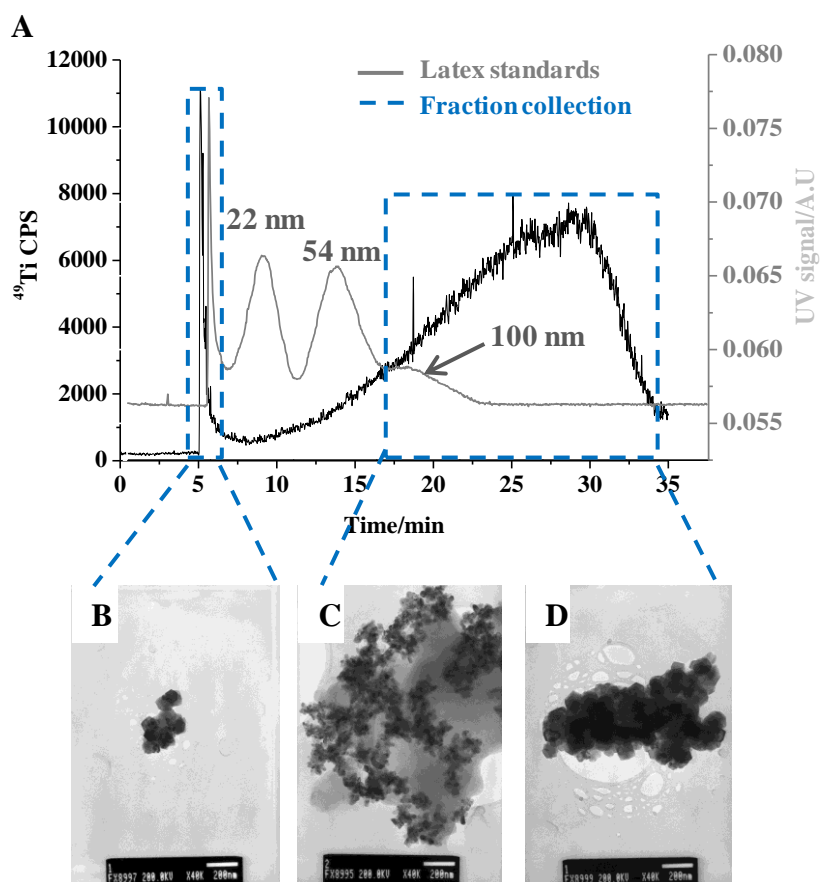


Figure 2

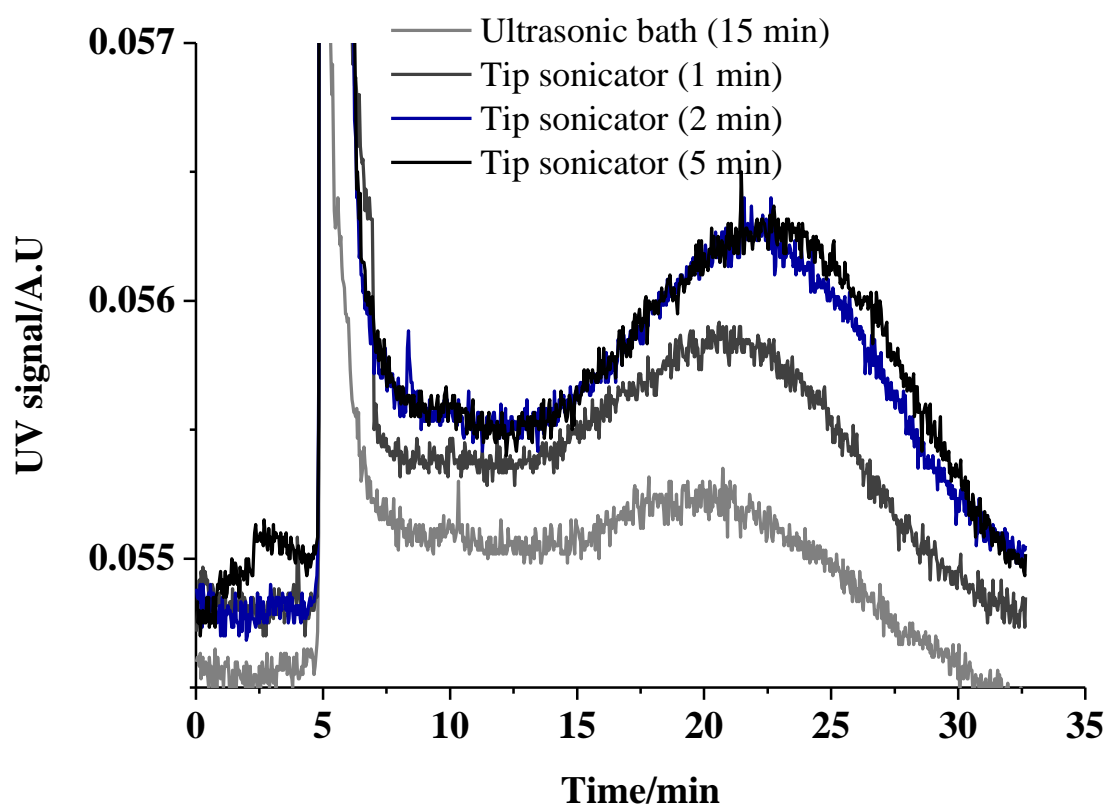


Figure 3

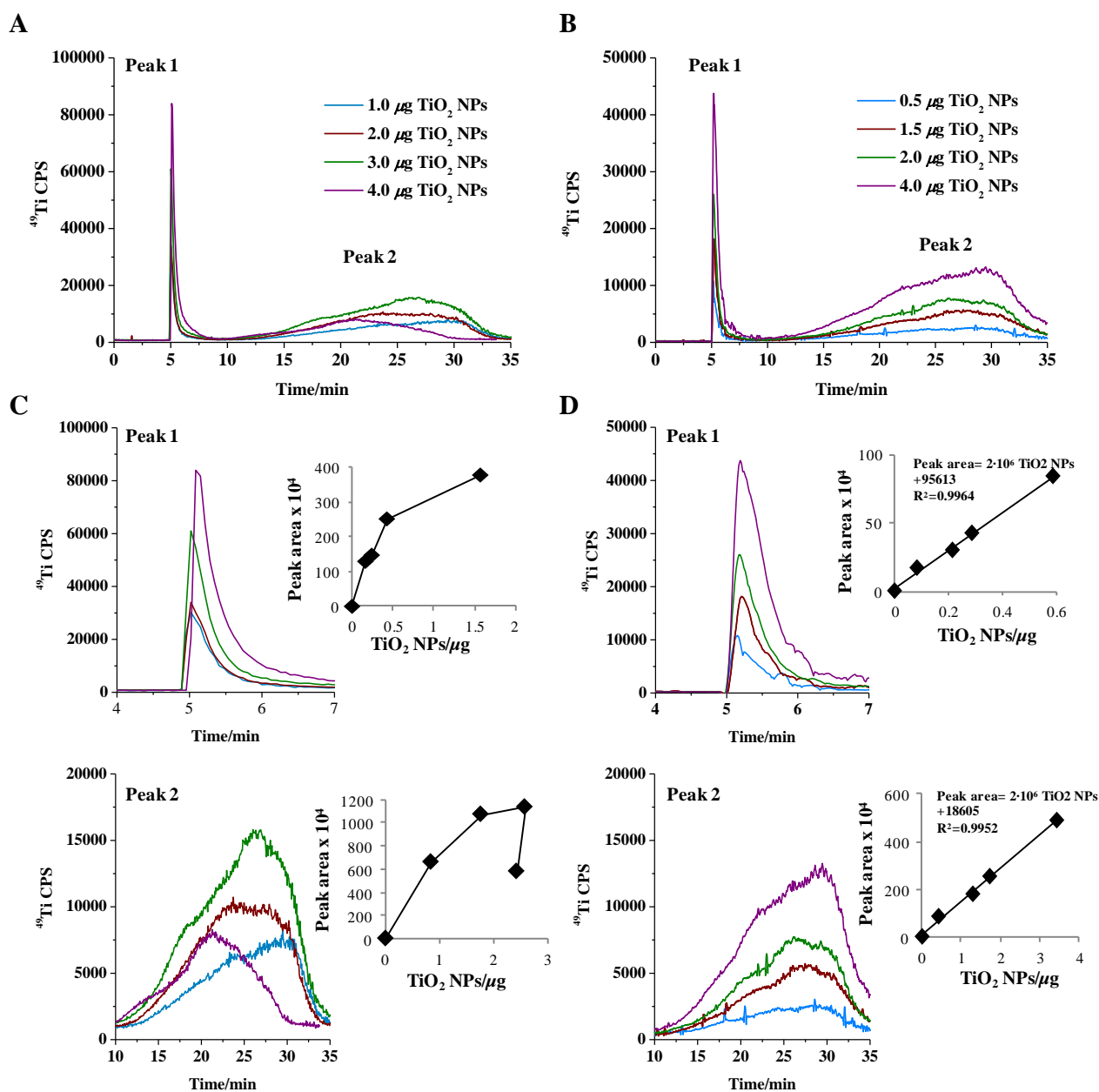


Figure 4

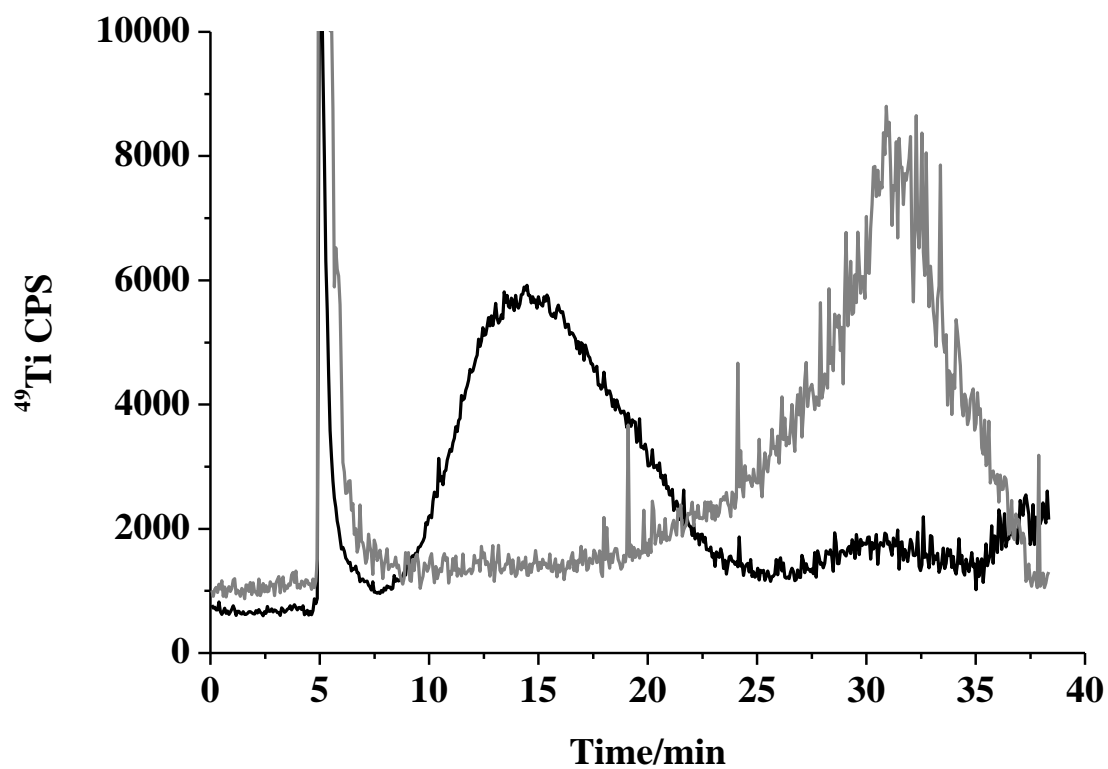


Table 1. Instrumental parameters of AF⁴ system

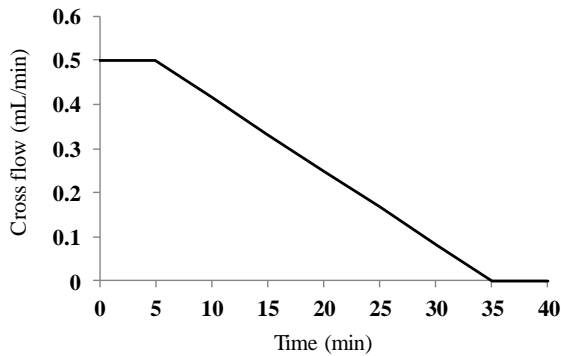
AF ⁴ operating parameters																					
Spacer height	350 μm																				
Membrane type	Regenerated cellulose (RC) with 10 kDa MWCO																				
Injection loop	200 μL																				
Carrier liquid	0.2% (w/v) SDS, 6% (v/v) MeOH at pH 8.7																				
Injection flow	0.2 mL/min																				
Focus flow	1.3 mL/min																				
Cross flow	0.5 mL/min																				
Detector flow	1 mL/min																				
Injection time	4 min																				
Elution program	 <table border="1"> <caption>Elution Program Data</caption> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>Cross flow (mL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>5</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>10</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>15</td><td>0.3</td></tr> <tr><td>20</td><td>0.2</td></tr> <tr><td>25</td><td>0.1</td></tr> <tr><td>30</td><td>0.0</td></tr> <tr><td>35</td><td>0.0</td></tr> <tr><td>40</td><td>0.0</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	Cross flow (mL/min)	0	0.5	5	0.5	10	0.4	15	0.3	20	0.2	25	0.1	30	0.0	35	0.0	40	0.0
Time (min)	Cross flow (mL/min)																				
0	0.5																				
5	0.5																				
10	0.4																				
15	0.3																				
20	0.2																				
25	0.1																				
30	0.0																				
35	0.0																				
40	0.0																				
UV detection of TiO ₂ NPs	$\lambda = 270 \text{ nm}$																				
UV detection of polystyrene latex standards	$\lambda = 280 \text{ nm}$																				

Table 2. TiO₂ quantification in consumer products

	Total Ti (mg Ti/kg sample), (w/w (%)) ^a	Extracted Ti (mg Ti/kg sample)		TiO ₂ NPs quantification after AF ⁴ analysis (mg Ti/kg sample), (R (%)) ^d	
		Rutile TiO ₂ NPs standard ^b	ionic Ti standard ^c	Online analysis	Offline analysis
Cosmetic products					
Moisturizing cream (SPF 10)	3865±139, (0.40±0.01)	3770±24	1586±59	3699±145, (98±4)	4336±685, (112±18) ^e 4630±1447, (120±37) ^f
Makeup (SPF 25-35)	54278±1577, (5.4±0.2)	29581±1629	11377±625	7843±471, (27±1)	9019±180, (31±1) ^e 9412±471, (32±2) ^f
Food					
Sugar glass	938±103, (0.09±0.01)	n.q	n.q	n.d	n.d
Coffee cream	713±47, (0.07±0.01)	n.q	n.q	n.d	n.d

a. Ti concentrations achieved after acid digestion of samples and their corresponding Ti percentages.

b. Ti concentration calculated by FIA-ICPMS analysis using rutile TiO₂ NPs as the calibration standard (Method 1).

c. Ti concentration calculated by FIA-ICPMS analysis using an ionic Ti solution as the calibration standard (Method 2).

d. Recoveries calculated by comparing the Ti concentrations obtained by online and offline analysis with the Ti obtained after aqueous extraction.

e. Ti concentration found in fractions collected from the AF⁴ system. FIA-ICPMS analysis using rutile TiO₂ NPs as the calibration standard

f. Ti concentration found in fraction collected from the AF⁴ system. FIA-ICPMS analysis using an ionic Ti solution as the calibration standard

n.q. Ti not quantified.

n.d. Ti not detected.

The columns indicate mean values ± standard deviation (n = 3).

1
2
3 **Figure 1.** Overlaid fractograms corresponding to the separation of a mixture of
4 polystyrene latex standards (grey line) and rutile TiO₂ NPs standard (black line)
5
6 analysis by AF⁴-UV and AF⁴-ICPMS, respectively (A). TEM images of rutile TiO₂ NPs
7
8 standard aggregates found in fractions collected from the AF⁴ system. High
9
10 magnification images of a fraction corresponding to the broad peak shows numerous
11
12 TiO₂ NPs aggregates of around 200 nm (C), and larger aggregates whose size reached
13
14 1 μm (D). TEM images of the narrow peak (“void peak”) shows a less pronounced
15
16 aggregation state (B). The scale bar represents 200 nm and the magnification of the
17
18 images is 40 k.
19
20
21
22
23

24 **Figure 2.** AF⁴-UV fractograms showing the effect of ultrasound energy on the recovery
25
26 of the rutile TiO₂ NPs standard.
27
28

29 **Figure 3.** AF⁴-ICPMS fractograms obtained after injection of different amounts of the
30
31 rutile TiO₂ NPs standard. The fractograms show the external calibration approach
32
33 carried out by using ultrasonic bath (for 10 min) (A) or tip sonicator (for 2 min) (B) in
34
35 standard stabilization. Peak 1 and peak 2 magnification are showed below (C and D)
36
37 with their corresponding calibration curves.
38
39
40

41 **Figure 4.** AF⁴-ICPMS fractograms showing the detection of TiO₂ NPs in samples from
42
43 cosmetic products: moisturizing cream (grey line) and makeup (black line).
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

**Biotransformación, Acumulación y Toxicidad de Especies de Selenio.
Caracterización de Nanopartículas.**

DISCUSIÓN INTEGRADORA

DISCUSIÓN INTEGRADORA

El trabajo de investigación desarrollado en esta memoria presenta una doble finalidad. Por un lado se han llevado a cabo estudios de bioacumulación y biotransformación de Se en plantas y pescados, con el fin de evaluar el metabolismo de este elemento esencial en organismos vivos. Por otra parte, se ha abordado la problemática asociada a la falta de información sobre los efectos biológicos de las NPs de Se. Los resultados obtenidos se han utilizado como base para profundizar en los mecanismos citotóxicos involucrados en la interacción entre las NPs y las células. El estudio de esta temática supuso la aplicación de una plétora de técnicas tanto para la determinación del Se en forma elemental (ICP-MS), como para el estudio de los efectos citotóxicos de las NPs (ensayos espectrofotométricos e inmunofluorescentes, citometría de flujo, microscopía de transmisión electrónica, y proteómica cuantitativa)

Paralelamente, y debido a la enorme presencia de las NPs en multitud de productos de consumo, las investigaciones relacionadas con el área de las NPs se completaron gracias al desarrollo de un método analítico basado en el empleo de la técnica AF⁴ acoplada a UV-VIS e ICP-MS para la caracterización y cuantificación de éstas. En particular se trabajó con NPs de TiO₂, las cuales aparecen comúnmente en la formulación de cremas de protección solar y productos cosméticos. Para ello se inició una línea de investigación basada en el empleo de AF⁴-ICP-MS para la separación, detección y cuantificación de estas NPs tanto en productos

alimenticios como en productos cosméticos. Los resultados obtenidos fueron complementados con los datos proporcionados por la microscopía de transmisión electrónica.

A continuación, se discuten globalmente los resultados obtenidos tras la realización de los diferentes trabajos encuadrados en la presente Tesis Doctoral.

El empleo de alimentos funcionales, enriquecidos en Se, constituye una vía muy atractiva para paliar la posible deficiencia del contenido de selenio en la dieta. Los vegetales enriquecidos en Se pueden ser una alternativa de gran interés tanto para la alimentación humana como animal. Muchas plantas son capaces de acumular y transformar el Se presente en los suelos, lo que conlleva a considerarlas unas de las principales fuentes de este elemento en la dieta. Dada la baja biodisponibilidad de Se en la mayoría de los suelos, se están desarrollando **programas de biofortificación destinados a incrementar el contenido de Se en las plantas para el consumo humano y animal.**

Las especies pertenecientes a la familia de las *Brassica* son capaces de acumular elevadas cantidades de Se en sus tejidos convirtiéndolas en perfectas candidatas para llevar a cabo procesos de biofortificación. En nuestros estudios se ha demostrado que las especies *Brassica rapa* y *Brassica napus*, dos variedades de colza, son capaces también de acumular elevadas cantidades de Se en la fracción proteica de sus semillas (HCD, harina de colza desgrasada) sin mostrar síntomas de toxicidad.

En estudios realizados por otros autores, se ha observado que la suplementación con Se puede conllevar a un aumento en la eficiencia de producción de biomasa y harinas. Sin embargo, en el trabajo presentado en esta memoria, los diferentes tratamientos de biofortificación con Se, aplicado en forma de selenito y seleniato, tanto al suelo como de forma foliar, no originaron cambios en la producción de biomasa pero sí en la morfología de las plantas. En este sentido, se observó la presencia de más silicuas (referido al fruto seco deshidratado) formando la rama principal, indicando que la disponibilidad o distribución de los carbohidratos en el interior de la planta puede alterarse tras el tratamiento con Se.

Los distintos procesos de biofortificación estudiados en este trabajo se diferencian en dos condiciones experimentales clave: forma química del Se adicionado (selenito y/o seleniato), y su manera de suplementación (adición al suelo de cultivo y/o aplicación foliar). Los resultados obtenidos tras los diferentes tratamientos se reflejan en las concentraciones de Se determinadas en las HCD. Aunque la aplicación foliar de seleniato fue suficiente para aumentar

la cantidad de Se en HCD, el mayor efecto en labioacumulación se observó tras la adición del selenio al suelo.

A pesar de la capacidad de bioacumulación de las semillas de esta especie, el porcentaje de Se encontrado en las semillas con respecto a la cantidad de Se inorgánico aplicado al suelo de cultivo fue bajo, aproximadamente del 6%. Estos bajos valores de recuperación difieren de los encontrados en otros cultivos biofortificados con Se, como en el caso del trigo, donde el porcentaje de Se en granos estaba dentro del intervalo 25-30%. Una de las principales razones de esta diferencia puede ser la baja producción de las semillas en las especies de *Brassica*.

Para el estudio de la biotransformación de Se se llevó a cabo una extracción previa de las especies mediante hidrólisis enzimática y posterior determinación por LC-ICP-MS utilizando dos columnas cromatográficas (intercambio aniónico y fase reversa). A pesar de que se han llevado a cabo numerosos trabajos para la caracterización de especies de Se en muestras vegetales, conseguir una cuantificación precisa de las mismas sigue siendo un reto analítico. Los principales problemas asociados son: la baja eficiencia de extracción de las especies, así como la posible interconversión y degradación de las mismas durante el proceso de tratamiento de la muestra. En este estudio, se optimizó una metodología analítica basada en el empleo de LC-ICP-MS. El empleo de la extracción enzimática, gracias a la acción de la enzima Pronasa E y a la energía de la sonda de ultrasonidos, permitió una extracción cuantitativa de las especies de Se en un tiempo de 2 min. La acción de los ultrasonidos focalizados mejora la ruptura de proteínas y estructuras complejas y ha sido aplicada con éxito en matrices vegetales y levaduras selenizadas. El proceso de cavitación, acelera las reacciones químicas muestra-extractante, además favorece la ruptura de la pared celular del tejido, facilitando el contacto de la muestra y la enzima; resultando en definitiva, en una considerable disminución del tiempo requerido en el proceso y una mayor eficacia para la extracción de selenoamino ácidos. El principal inconveniente de esta técnica radica en que durante el proceso de sonicación se pueden generar radicales activos que produzcan la degradación de las especies inicialmente presentes en las muestras. Con el objetivo de evaluar la eficiencia de la extracción, en nuestro estudio se compararon dos metodologías enzimáticas: incubación a temperatura controlada o la utilización de la sonda de ultrasonidos focalizada. En los perfiles cromatográficos de los extractos enzimáticos no se observaron diferencias relevantes. Este hecho demuestra que el uso de la sonda de ultrasonidos focalizada no sólo permite la extracción cuantitativa en un tiempo mínimo, sino que evita la degradación o transformación de especies. Por otro lado, la identificación de especies de Se se validó mediante el empleo de dos columnas cromatográficas con mecanismos diferentes (intercambio aniónico y exclusión

molecular/intercambio aniónico). El empleo de dichas columnas no solo permitió llevar a cabo una correcta identificación de las especies de selenio sino también asegurar un balance cuantitativo de masas.

Los estudios de especiación con las especies de *Brassica* se han focalizado en su parte aérea, siendo este trabajo, el primero en el que se pone de manifiesto la capacidad de biotransformación de sus semillas. Los resultados obtenidos de la especiación de Se en las semillas demostraron que las dos formas químicas, selenito y seleniato, se metabolizan a la especie SeMet. Los mayores porcentajes de biotransformación se observaron cuando se adicionó previamente Se como seleniato al suelo. En concreto, un 85% del Se bioacumulado se encontró en la forma de este compuesto orgánico. Un porcentaje similar de SeMet se encontró en levaduras selenizadas, muy usadas como suplementos en alimentación. Además, se demostró que este porcentaje conllevó a un aumento de la actividad de la enzima antioxidante GSH-Px. La SeMet junto con el Se(VI) han sido también las especies identificadas en granos de cereal y tubérculos de patata. Sin embargo, en otros estudios realizados en hojas, flores y raíces de muestras de brócoli, ajos, y cebollas enriquecidas, el compuesto de Se mayoritario fue la SeMeSeCys. La diferencia se debe principalmente a las características acumuladoras o no acumuladoras de las plantas. Los ajos y cebollas pertenecen a la familia *Allium*. Esta especie se caracteriza por acumular elevadas cantidades de Se y biotransformarlo a SeMeSeCys, aminoácido no proteógeno que tiene un papel clave en el proceso de detoxificación de las plantas

La HCD se obtiene tras un proceso de desgrasado de las semillas de *Brassica*, y por lo tanto es de vital importancia evaluar posibles alteraciones en la bioacumulación y biotransformación de Se tras la aplicación de este proceso. La presencia de niveles similares de SeMet en las semillas y en las HCD implicó que el proceso de desgrasado de las semillas no alteraba las especies presentes.

Los resultados obtenidos reflejan que los procesos de biofortificación no sólo son capaces de aumentar los niveles de Se en los tejidos de las especies de *Brassica*, sino que proporcionan un notable aumento del valor nutricional de sus semillas. La HCD enriquecida en Se puede ser usada como fuente de proteínas en la dietas y además puede aumentar significativamente los niveles de SeMet en rumiantes.

En esta memoria, los estudios de especiación de Se no han sido solamente importantes desde el punto de vista del desarrollo de alimentos enriquecidos en selenio para la alimentación animal, sino también para la **elucidación de los mecanismos de tolerancia y transporte de Se en vegetales**. Se conoce que la tolerancia de Se en plantas está relacionada con la síntesis de seleno aminoácidos no estructurales, permitiendo de este modo acumular elevadas cantidades de Se sin mostrar síntomas de toxicidad. A través de la síntesis de estos seleno aminoácidos, como la SeMeSeCys, se evita la unión del Se a proteínas y a los sitios activos de ciertas enzimas. Este tipo de mecanismo está presente en plantas hiperacumuladoras, como *Astragalus bisulcatus* y *Stanleya pinnata*, mientras que en plantas no acumuladoras, la ausencia de estos compuestos hace que los síntomas de toxicidad sean bastante más severos al alcanzar ciertos niveles de Se.

La acumulación de la especie SeMeSeCys está estrechamente relacionada con una elevada expresión del gen SMT (selenometiltransferasa). Esta enzima es la responsable de metilar la SeCys a SeMeSeCys en las plantas hiperacumuladoras. La actividad de la enzima SMT también está relacionada con la acumulación de otras especies como la metilcisteína (MeCys). En plantas acumuladoras secundarias, como *Synlaxis albescens*, la principal forma de acumulación de Se identificada ha sido la selenocistationa (Se-Cyst), un intermedario metabólico entre la SeCys y la SeMet.

Los estudios realizados en la parte aérea de la especie *Brassica napus* reflejaron que el metabolismo del Se, a pesar de la elevada capacidad de acumulación mostrada en sus semillas, se asemeja al de las especies no acumuladoras o acumuladoras secundarias. Mientras que en la especie *Astragalus bisulcatus*, prácticamente un 90% del Se se metaboliza a SeMeSeCys durante sus estados iniciales, en *Brassica napus* solamente se cuantificó un 4% de este compuesto tras 6 horas de tratamiento. Por otra parte, la secuencia del gen SMT reveló una homología con las especies no acumuladoras, como *Astragalus drummondii*, *Astragalus crassicaarpus* y *Astragalus leptocarpus*, en las que un residuo de tirosina (Tyr) se encuentra sustituyendo a un residuo de fenilalanina (Phe) en la posición 184.

De manera similar a como se ha comprobado con otras plantas acumuladoras secundarias, la adición de selenito y seleniato activa la expresión de los genes encargados de la asimilación de azufre. Prácticamente a las 6 horas de la aplicación de Se se observó un aumento de 1.5 a 2 veces en la expresión de las enzimas APS (adenosina trifosfato sulforilasa) y SMT. También es importante comentar que dependiendo de la cantidad y la forma química del Se aplicado se activaron diferentes isoformas de APS.

La especies orgánicas identificadas en la parte área de *Brassica napus*: SeMet, SeOMet y SeMeSeCys, coinciden con las especies acumuladas en cultivos de trigo biofortificados con Se. Por el contrario, no se detectaron otras especies como la SeCys, y la SeCys. La SeCys es un sustrato necesario para la síntesis de SeMeSeCys, por lo que su ausencia puede estar estrechamente relacionada con los bajos niveles e incluso con la ausencia de SeMeSeCys en varias de nuestras muestras. Estos resultados sugieren que ni la síntesis de SeCys ni la metilación de SeCys son los principales mecanismos de detoxificación de Se en *Brassica napus*.

La SeOMet solo se detectó en las plantas a las que se les adicionó Se de forma foliar. La SeOMet es un producto de oxidación generado por varios factores del proceso analítico: muestreo, almacenamiento y tratamiento de muestra. En la columna de intercambio aniónico PRP-X100 esta especie coincide en tiempo de retención con la SeCys, por lo que fue necesario el empleo de un mecanismo de separación cromatográfico alternativo, basado en la exclusión molecular/intercambio aniónico, para confirmar su presencia.

El Se adicionado al suelo como seleniato se asimiló de forma muy rápida. Se observó que tras 6 horas de tratamiento, el 15% del Se total se biotransformó a SeMet en la parte aérea de las plantas. Este porcentaje aumentó al 33% tras 14 días de exposición. Sin embargo, cuando la aplicación de selenito y seleniato se llevó a cabo de forma foliar se observó una biotransformación y acumulación de SeMet menos acentuada.

Al igual que en las semillas y HCD, la SeMet fue la especie mayoritaria en la parte aérea en la última etapa del tratamiento. Una de las razones de los altos porcentajes de SeMet y los bajos niveles de SeMeSeCys encontrados en la parte aérea y en las semillas pueden atribuirse a la función dual de SMT/HMT. La enzima HMT es la responsable de catalizar la transformación de S-adenosilmetionina (AdoMet) a Met en el ciclo de la asimilación del azufre. En las plantas no acumuladoras, la función dual SMT/HMT puede proporcionar un mecanismo alternativo para la metilación de SeCys y HoCys, y juega un papel único en el metabolismo del S y del Se.

La acumulación moderada de SeMeSeCys puso de manifiesto que la incorporación del exceso de Se a amino ácidos no proteicos no es eficiente en este tipo de cultivos y como consecuencia, se detectó una retardación en el crecimiento de las plantas. Ciertos valores de Se pueden causar una reducción en el crecimiento de las plantas sin mostrar síntomas de toxicidad. Estos valores son dependientes de la especie, de la forma química del Se aplicado y también de la disponibilidad del este elemento en el suelo de cultivo. Como se ha mencionado anteriormente, en nuestros experimentos los tratamientos de biofortificación resultaron en una reducción de la biomasa de las plantas. Esta disminución puede ser debida a una

perturbación metabólica causada por la rápida acumulación del Se inorgánico en la parte aérea de las plantas y la biotransformación de éste a compuestos orgánicos.

Los estudios de Se no solamente se centraron en las plantas sino también en pescados con el fin de llevar a cabo un estudio metabólico de este elemento. Dos de los trabajos desarrollados en esta memoria se encuadran en un proyecto de colaboración con el Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas de CUBA. Ambos están focalizados en los procesos de bioacumulación y biotransformación de Se en **la especie *Clarias gariepinus***. Esta especie de pescado constituye una de las principales fuentes de alimentación de la población de la Ciudad de Sagua la Grande, en Cuba. Este pescado posee un elevado contenido de selenio y se presenta como una matriz muy adecuada para la realización de estudios de especiación.

Las muestras de *Clarias gariepinus* fueron tomadas de tres estaciones de muestreo: dos de ellas localizadas en el río Sagua la Grande, y la otra en un canal de irrigación. Una de las estaciones, localizada en el sur de la ciudad, se encuentra muy próxima a la salida de un punto de descarga de una planta de cloro-álcali. Además de la concentración de Se, fue importante determinar los niveles de As y Hg, establecer correlaciones entre los elementos y evaluar el potencial riesgo que la ingesta de estos pescados supone para la salud de los consumidores. Para la determinación de los contenidos totales de Se se llevó a cabo una mineralización ácida en horno de microondas y posterior determinación por ICP-MS.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que: mientras que las concentraciones de As y Hg fueron similares en las muestras tomadas de las tres zonas (encontrándose por debajo de los niveles tolerables en Cuba respecto a la presencia de estos elementos en los pescados), los niveles de Se detectados fueron anormalmente elevados, entre 2.3 y 15.5 $\mu\text{g/g}$, en comparación con los datos encontrados en la bibliografía para otras especies de agua dulce, 0.21-0.64 $\mu\text{g/g}$. Además, se observaron diferencias significativas respecto a los contenidos de Se dependiendo de la zona de muestreo. Las concentraciones más elevadas se encontraron en las muestras tomadas de la estación más lejana a la ciudad, de difícil acceso y menos propensa a la contaminación.

En base a la información publicada sobre las fuentes de Se en esta zona, no existe evidencia de ninguna fuente antropogénica que aumente la concentración de este elemento. Por este motivo, la hipótesis de este estudio fue que las elevadas concentraciones de Se encontrados en las muestras de *Clarias gariepinus* estaban directamente relacionados con los niveles de este elemento en el medio acuático. Sin embargo, son necesarios más estudios sobre los

niveles de Se en el ambiente acuático, rocas y sedimentos de la ciudad Sagua la Grande para obtener conclusiones definitivas sobre los mecanismos de transferencia de Se.

Se conoce que los pescados son capaces de acumular Se del medio ambiente de una manera relativamente rápida. La especie *Clarias gariepinus* incrementa su tamaño en un tiempo relativamente corto y además no sólo se alimenta de pescados, sino también de pájaros, insectos, moluscos, crustáceos e incluso de plantas de la zona. Cualquiera de estas fuentes pueden ser el origen de los elevados contenidos de Se encontrados en estos pescados. De hecho, el tamaño de las muestras también está directamente relacionado con la diferencia en las concentraciones de Se, y en esta línea se observó que las muestras de mayor tamaño contenían los niveles de Se más elevados.

El papel antagonista que ejerce el Se frente a la toxicidad del Hg se ha publicado en varios estudios. De hecho, en algunas muestras de pescado se ha observado que por debajo de ciertos niveles de Se, las concentraciones de Hg tienden a aumentar. Esta tendencia se ha observado en el estudio realizado. Sin embargo, para poder concluir esta hipótesis son necesarios un mayor número de datos experimentales

Respecto a la calidad de los resultados analíticos, el uso de materiales de referencia certificados supone una de las alternativas más adecuadas para contrastar los resultados obtenidos. Idealmente, el material de referencia seleccionado debe ser muy similar en matriz y composición a la muestra objeto de estudio. Para validar las concentraciones de As, Hg y Se en las muestras de pescado, el proceso de mineralización se aplicó sobre tres materiales de referencia: CRM-627 (atún certificado para el As), CRM-463 (atún certificado para el MeHg), y Murst-ISS A22 (crustáceo certificado para el Se). En todos los casos las diferencias encontradas entre el valor certificado y el obtenido mediante el método de digestión ácida no fueron significativas al nivel de probabilidad del 95%.

En Cuba, los niveles de Se en productos de consumo humano no están todavía regulados. Las elevadas concentraciones de Se derivadas de nuestro estudio convierten a la especie *Clarias gariepinus* en una matriz interesante para llevar a cabo estudios de especiación. Debido a que el Se inorgánico puede llegar producir efectos tóxicos en los organismos acuáticos, y por consiguiente en los seres humanos, el conocer la forma química en la cual se encuentra el Se bioacumulado puede resultar de gran interés.

Tal y como se ha comentado anteriormente, para llevar a cabo una correcta identificación de las especies es de vital importancia desarrollar métodos analíticos que nos permitan

obtener eficiencias de extracción cuantitativas sin modificar la estabilidad de las especies. Dependiendo del tipo de matriz, esta finalidad puede resultar más o menos complicada. Las muestras de pescado se consideran una matriz “problemática”, principalmente debido a su alto contenido lipídico.

Con el fin de extraer cuantitativamente los seleno-compuestos presentes en las muestras de *Clarias gariepinus*, reduciendo el tiempo de los procesos de hidrólisis enzimática convencionales, se evaluó el efecto de una serie de variables: relación muestra/enzima, medio de extracción, concentración de urea, han sido evaluadas. En primer lugar, se optimizó la relación muestra/enzima (Pronasa E) (2.5:1, 5:1 y 10:1) y el medio de extracción (50 mM de tampón fosfato frente a una concentración 7 M de urea). Tras la aplicación de tres metodologías de extracción diferentes (extracción enzimática asistida por sonda de ultrasonidos, extracción enzimática asistida por microondas e incubación a temperatura controlada) se pudo constatar que la relación muestra/Pronasa E 2.5:1, y el empleo de una concentración 7 M de urea en el medio de extracción fueron las condiciones más adecuadas. Las relaciones muestra/enzima evaluadas en este estudio se vieron notablemente afectadas por el medio de extracción empleado. En todos los casos, las eficiencias de extracción fueron superiores tras la adición de urea a la solución extractante. Generalmente, el Se en muestras biológicas se encuentra unido a péptidos y proteínas, siendo necesario romper estas estructuras para obtener una extracción cuantitativa. La urea se caracteriza por ser un agente desnaturizante de proteínas, por lo que tiene sentido que la adición de este compuesto en los protocolos de hidrólisis muestre un efecto positivo en la extracción de las seleno-especies. Sin embargo, estas condiciones no fueron suficientes para conseguir una extracción cuantitativa, probablemente debido al efecto negativo que pueden ejercer las elevadas concentraciones de urea sobre la actividad de ciertas enzimas. Otros autores han puesto en evidencia que el empleo de bajas concentraciones de urea puede hasta triplicar la eficiencia de extracción de las especies de Se. Como conclusión, la urea resultó ser un factor clave, y por lo tanto fue necesario investigar el efecto de su concentración (1 M y 7 M) sobre la eficiencia de extracción. Los resultados obtenidos sugirieron la necesidad de llevar a cabo un protocolo de extracción basado en dos etapas. En la primera etapa, el empleo de una concentración de urea 7 M junto con la acción de la sonda de ultrasonidos fue suficiente para desnaturizar las estructuras proteicas. En la segunda etapa, donde tiene lugar la hidrólisis enzimática mediante la adición de Pronasa E, fue clave llevar a cabo una reducción de la concentración de urea hasta 1 M. La optimización de este protocolo nos permitió obtener una eficiencia de extracción cercana al 100% en tan sólo 4 min de tratamiento. Nuestros resultados se encuentran en

concordancia con los estudios realizados por otros autores, en los que una concentración de urea apropiada puede aumentar notablemente la extracción de las especies de Se.

Del mismo modo que en los estudios de especiación llevados a cabo en las semillas y parte aérea de *Brassica napus*, el empleo de la sonda de ultrasonidos supuso una drástica reducción del tiempo de tratamiento de muestra de músculo de pescado (4 min frente a los 30 min y 24 h de la extracción asistida por microondas e incubación, respectivamente), demostrando que su empleo no afectó a la estabilidad de las especies.

A pesar de conseguir una extracción de especies cuantitativa, la recuperación de especies tras el análisis cromatográfico de los extractos enzimáticos de músculo de pescado mediante cromatografía de intercambio iónico y fase reversa, y posterior detección por ICP-MS, fue cercana al 30% respecto al Se total extraído. Este porcentaje correspondió a la especie SeMet, el único compuesto de Se detectado en los extractos enzimáticos.

Los resultados obtenidos en este trabajo están en consonancia con los aparecidos en la bibliografía, en los que se publican bajas recuperaciones de Se para distintos tipos de pescados: 28% para atún, 35% para mariscos, y un 38% para el material de referencia de tejido de atún BCR-627. La imposibilidad de obtener un balance de masas cuantitativo puede ser debido a que en matrices marinas, algunos compuestos de Se pueden estar unidos a estructuras peptídicas que permanecen inalteradas después de la extracción enzimática. Estos compuestos quedan retenidos en las columnas cromatográficas, dando lugar a bajos valores de recuperación de selenio en los pescados. Los análisis de los extractos enzimáticos de los músculos de pescado mediante SEC-ICP-MS corroboraron esta hipótesis. En los cromatogramas se observaron dos picos, uno de ellos identificado como SeMet (correspondiente al 30% del Se total). Sin embargo, la mayor parte del Se (el 60%) fue detectada en el otro pico correspondiente a compuestos de mayor peso molecular (5KDa). En un primer momento se pensó que la especificidad de la enzima utilizada no fue suficiente para romper esta unión. La aplicación de una segunda hidrólisis enzimática a esta fracción, o el empleo de enzimas generalmente utilizadas en la preparación de hidrolizados de pescados, como la Alcalasa, no proporcionaron resultados satisfactorios. Estos resultados indicaron que prácticamente el 60% del Se acumulado en *Clarias gariepinus* se encontraba asociado a compuestos orgánicos resistentes a la acción de las enzimas proteolíticas. Datos similares han sido observados en la muestra de *Engraulis japonicas* (anchoa), donde el Se también se encontró unido a compuestos orgánicos de 5 kDa, diferentes de selenoamino ácidos.

El porcentaje de SeMet fue prácticamente el mismo empleando los tres mecanismos cromatográficos (intercambio aniónico, fase inversa y exclusión molecular). Debido a que era la única especie que se extraía de forma cuantitativa, se procedió a su cuantificación mediante dilución isotópica de especies específica. Para ello se empleó la aproximación de **'exact matching' species specific isotopic dilution LC-ICPMS**, utilizando $^{76}\text{SeMet}$ como trazador. No se observaron diferencias significativas en la cuantificación de SeMet mediante dilución isotópica y el método de adición estándar empleando los mecanismos de LC convencionales, 2.18 ± 0.04 mg SeMet/kg y 2.0 ± 0.1 mg SeMet/kg, respectivamente.

Como ya se ha demostrado en los trabajos relacionados con la bioacumulación y biotransformación de Se en muestras biológicas, una correcta identificación de las especies de Se es clave para determinar las funciones biológicas de este elemento. Las propiedades antioxidantes y el carácter quimiopreventivo de especies como la SeMet y la SeMetSeCys se han estudiado en numerosas ocasiones. Actualmente, se está empezando a considerar una "nueva especie" de Se a la hora de llevar a cabo estudios biológicos y de toxicidad. Este compuesto son las NPs de Se. Hasta el momento, ya han sido varios los autores que han puesto de manifiesto los prometedores efectos beneficiosos de estas NPs. Sin embargo, son necesarios más estudios para profundizar en sus interacciones con los organismos vivos y en los mecanismos involucrados. Debido a esta necesidad, y por los motivos comentados anteriormente, la última parte de esta Tesis Doctoral se ha centrado en el **estudio de las NPs de Se**, y en la **evaluación de sus efectos biológicos en la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2**.

La primera etapa llevada a cabo en el desarrollo de este trabajo consistió en la optimización de un método de síntesis de NPs de Se. En muchos trabajos se ha demostrado la importancia de emplear agentes estabilizantes en el medio de reacción con el fin de obtener dispersiones de NPs estables. Dentro de los agentes estabilizantes más comunes usados en la síntesis de NPs de Se se encuentran: los monosacáridos (glucosa), oligosacáridos (sucrosa) y polisacáridos (chitosan). En nuestro trabajo, las NPs de Se se sintetizaron a partir de una reacción redox entre el ácido ascórbico y el Na_2SeO_3 , empleando el polisacárido chitosan (CS) como agente estabilizante. La selección de este agente no sólo se basó en su capacidad para modificar el tamaño, morfología, y estado de agregación de las NPs, sino también sus propiedades biológicas. En un estudio realizado por otros autores se demostró que la encapsulación de selenito en NPs de CS favoreció la asimilación de éste por parte de las células, y fomentó sus propiedades antioxidantes. El mecanismo a través del cual el CS evita la aglomeración de las NPs es el siguiente: las cadenas de CS están formadas por numerosos

grupos hidroxilo y amino. Los grupos hidroxilo se unen a las moléculas de ácido ascórbico y el selenito a través de fuertes enlaces de hidrógeno, quedando de esta forma, las NPs de Se sintetizadas atrapadas en las cadenas de CS. Por otro lado, los grupos amino se encuentran cargados positivamente en medio ácido, lo que conlleva a una repulsión de cargas entre las cadenas de CS y por consiguiente a la dispersión de las NPs. La morfología de las NPs sintetizadas fue esférica para todos los porcentajes de CS empleados (desde 0.01% a 0.1%). Sin embargo, la distribución de tamaños se vio afectada de manera notable. Empleando una concentración de CS de 0.1% se consiguió la síntesis de NPs con un tamaño comprendido entre 40-60 nm, y una distribución de tamaños poco dispersa.

Uno de los principales factores a tener en cuenta a la hora de desarrollar un ensayo in vitro es la estabilidad de las NPs en las condiciones fisiológicas empleadas. Las proteínas, electrolitos y otras sustancias presentes en el medio de cultivo tienden a interactuar con las NPs lo que puede dar lugar a una modificación de su estado de agregación, o incluso alterar la interacción entre las NPs y las células, afectando a su citotoxicidad. En nuestro caso no se observó la agregación de las NPs, ni la oxidación de éstas, ya que solo un porcentaje inferior al 0.1% se cuantificó como Se iónico tras la ultra-centrifugación de la dispersión y posterior análisis mediante ICP-MS.

El estudio de la viabilidad celular fue el primer ensayo llevado a cabo para evaluar los efectos biológicos de las NPs de Se. Para ello, las células HepG2 se trataron con diferentes concentraciones de NPs (en el intervalo de 0.1-20 mg/L) durante dos tiempos de exposición (24 y 48 horas). Los resultados de este ensayo demostraron que las concentraciones muy elevadas de NPs de Se (10 mg/L y 20 mg/L expresadas como concentración de selenio) provocaron una disminución de la viabilidad celular prácticamente del 100%, mientras que las concentraciones más bajas (0.1 mg/L) tenían un efecto prácticamente insignificante. La concentración de NPs de Se seleccionada en nuestro estudio fue 1 mg/L. Bajo los efectos de esta concentración y tras 48 h de exposición, la viabilidad celular disminuyó aproximadamente un 30% con respecto a las células control. Ambas condiciones, 1 mg NPs de Se/L y 48 h, se consideraron adecuadas para evaluar los posibles cambios producidos en la expresión de proteínas en las células HepG2, y por lo tanto fueron la dosis y el tiempo empleados en todos los ensayos posteriores.

Una vez evaluada la viabilidad celular, el siguiente paso fue determinar si la reducción observada en la proliferación celular estaba desencadenada por la muerte celular (apoptosis y/o necrosis), o por el contrario era el resultado de una inhibición del crecimiento de las

células de hepatocarcinoma humano. La citometría de flujo fue la técnica seleccionada para investigar ambas hipótesis. Los datos obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los porcentajes de células necróticas y apoptóticas de las células tratadas y las células control. Sin embargo, si se observaron diferencias respecto al contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo celular (sub-G1, G0/G1, S, G2/M). En concreto, el porcentaje de células en la fase G2/M, correspondiente a la división celular, fue prácticamente inexistente en las células tratadas. Al igual que se ha observado para otras líneas celulares como HeLa y MDA-MB-231, estos resultados sugieren que las NPs de Se inhiben el crecimiento celular de las células HepG2 bloqueando el ciclo celular en la fase S, en la cual tiene lugar la síntesis de proteínas.

Uno de los factores más relevantes a la hora de determinar la citotoxicidad de las NPs, y entender los mecanismos biológicos implicados, es el grado de asimilación celular de las NPs. En muchos estudios realizados *in vitro* se ha observado que cantidad de NPs que consiguen atravesar la membrana celular, y localizarse en el interior de las células, está estrechamente relacionada con sus efectos citotóxicos. En este trabajo se estudio la asimilación de las NPs de Se por parte de las células empleando la técnica ICP-MS y la microscopía electrónica (TEM). En primer lugar se determinó el contenido de Se en el medio de cultivo, en la solución de lavado (PBS, *phosphate buffer saline*) y en las células (*pellet*) tras la mineralización de las muestras. Los niveles de Se cuantificados mediante ICP-MS mostraron que un 1% del Se adicionado al medio de cultivo se encontraba en el *pellet*. Para un análisis más exhaustivo de la forma química en la que se encontraba el Se (como NPs o como ion), y si éste se encontraba adherido a la membrana o localizado en el interior de las células, las células fueron observadas por TEM. Las imágenes proporcionadas por la microscopía electrónica nos permitieron detectar NPs de Se en vacuolas, distribuidas en el citoplasma, y en el interior de orgánulos como mitocondria y retículo endoplasmático. Ambos orgánulos presentan un papel clave en diferentes procesos celulares: aporte de energía celular, diferenciación celular y apoptosis. Las mitocondrias son uno de los orgánulos más sensibles a la presencia de sustancias exógenas. Además, en varios estudios se ha puesto de manifiesto que las NPs localizadas en estos orgánulos pueden desencadenar estrés oxidativo y daños estructurales. Junto con la mitocondria, el retículo endoplasmático es otro de los orgánulos más importantes en la respuesta al daño inducido por el estrés oxidativo.

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de NPs en vacuolas se observó por TEM. Este hecho, junto con la aparición de un elevado número de vacuolas en las células tratadas con respecto a las células control (aproximadamente un 90% de las células duplico el número de vacuolas tras el tratamiento con NPs de Se), sugirió que las NPs de Se son capaces

de atravesar la membrana celular a través del mecanismo de endocitosis (formación de invaginaciones en la membrana plasmática que terminan convirtiéndose en vacuolas).

Con el objetivo de profundizar en las respuestas biológicas observadas en anteriores ensayos, se identificaron las proteínas diferencialmente expresadas en las células HepG2 tras la exposición a las NPs de Se. Para ello se recurrió al marcaje metabólico (SILAC) y a la espectrometría de masas (nLC-MS/MS). De entre todas las proteínas cuantificadas, solamente se identificaron 41 proteínas de-reguladas debido a la presencia de las NPs. Entre las proteínas de-reguladas, 21 se encontraron sobre-expresadas y 21 inhibidas. Es importante resaltar los mecanismos en los cuales estas proteínas están directa o indirectamente implicadas: crecimiento y proliferación celular, síntesis de proteínas, replicación de ADN, metabolismo de ácidos nucleicos, modificaciones post-translacionales y muerte celular. Las proteínas de-reguladas implicadas en los procesos tanto de crecimiento y desarrollo celular, como en la síntesis de proteínas pueden estar estrechamente relacionadas con el efecto inhibitor que ejercen las NPs de Se sobre la proliferación celular. En este sentido, se profundizó en la expresión del complejo proteico factor de iniciación de translación eucariota (eIF3, *eukaryotic translation initiation factor 3*). Esta proteína está formada por 13 subunidades, y se considera uno de los mayores factores de iniciación encargado de coordinar la síntesis y degradación de proteínas. En este trabajo se identificaron 3 subunidades de eIF3 cuya expresión estaba de-regulada: eIF3f sobre-expresada y, eIF3m y eIF3d inhibidas. La subunidad eIF3m se ha encontrado expresada en varias líneas cancerígenas, y en otros trabajos se ha sugerido que su sobre-expresión está relacionada con la progresión cancerígena. La inhibición de la expresión de esta subunidad junto con eIF3d podría estar directamente relacionada con el efecto ejercido por las NPs de Se sobre las células HepG2.

Además de las subunidades identificadas mediante espectrometría de masas, existen otras subunidades, como la eIF3a y eIF3b, cuya expresión también se ha visto incrementada en algunas líneas cancerígenas. En las células HepG2 tratadas con NPs de Se se investigó la expresión de ambas subunidades empleando un ensayo de inmunofluorescencia, mostrando que las NPs de Se son capaces de inhibir la expresión tanto de eIF3a, como eIF3b. Este resultado fortalece la hipótesis de que el complejo eIF3 se encuentra implicado en el mecanismo que explicaría el efecto que ejercen las NPs de Se sobre las células de hepatocarcinoma humano.

Anteriormente se ha hecho referencia a otra subunidad del complejo eIF3, eIF3f. Al contrario que las otras subunidades, las NPs de Se inducen una sobre-expresión de esta

subunidad. eIF3f es la única que se ha encontrado inhibida en la mayoría de las células tumorales, y se caracteriza por su papel como supresor tumoral en varios tipos de cáncer. La identificación de esta subunidad sobre-expresada fomenta la idea de que las NPs de Se podrían actuar como agentes anticarcinogénicos.

Además del complejo eIF3, se encontraron de-reguladas otras proteínas implicadas en el estrés celular y la formación de vacuolas (VAPA, *vesicle-associated membrane protein-associated protein A*), en la protección frente al daño oxidativo (HSPA1A/HSPA1B, *heat shock 70 kDa protein 1A*), y en la supresión tumoral (CYFIP1, *cytoplasmatic FMR1 interacting protein 1*).

Los resultados obtenidos empleando la proteómica cuantitativa fueron validados silenciando (inhibir la expresión de un gen introduciendo en la célula material genético externo mediante un plásmido, vector vírico u otras herramientas de transferencia) una de las subunidades eIF3 afectadas por la presencia de NPs de Se en el cultivo celular, en concreto la subunidad eIF3b. Los perfiles del ciclo celular obtenidos tras los análisis de citometría de flujo de las células silenciadas/transfectadas y de las células tratadas con NPs de Se fueron similares. Al igual que en el caso de las NPs de Se, la población de células en la fase correspondiente a la síntesis de proteínas, crecimiento y división celular fue menor respecto a las células no transfectadas. Esta evidencia apoyó la hipótesis de que las NPs de Se inhiben la proliferación de las células HepG2 induciendo a un bloqueo del ciclo celular mediado por la proteína eIF3.

La capacidad de las NPs de Se para inhibir la proliferación celular también se demostró evaluando el grado de invasión celular. Las células se cultivaron sobre una matriz (MATRIGEL) compuesta principalmente por proteínas estructurales y semejantes al ambiente extracelular de muchos tejidos. En hecho de realizar este ensayo nos permitió observar el comportamiento de las células asociado a la presencia de las NPs de Se que de otra manera es imposible observar. Las diferencias observadas entre las células control, las cuales proliferaron formando ramificaciones, y las células tratadas con 1 ug/L de NPs de Se que permanecieron en el cultivo de forma individual, demostraron que las NPs de Se no sólo son adecuadas para inhibir la proliferación de las células HepG2 sino también para inhibir su capacidad invasiva a la hora de formar tejidos.

Tal y como se ha comentado en la INTRODUCCIÓN de esta memoria, la presencia de NPs está siendo cada vez más común en una amplia variedad de sectores, como medicina, textiles, cosmética, electrónica, y alimentos. Uno de los NMs que se usan con mayor frecuencia son las NPs de TiO_2 . Entre sus aplicaciones se encuentran: como aditivos y agentes anticoagulantes en productos alimenticios, y como protectores frente a la radiación UV en cremas solares y productos cosméticos.

La obtención de información sobre el tamaño de las NPs, forma, área superficial, carga y reactividad es clave para evaluar su toxicidad y comportamiento en el organismo y medio ambiente. En este sentido, el desarrollo de metodologías que permitan su correcta caracterización y proporcionen información cuantitativa sigue siendo una de las necesidades analíticas más abordadas. Uno de los trabajos presentados en esta memoria se encuentra focalizado en esta problemática, en el **desarrollo de una metodología analítica para solventar las cuestiones relacionadas con la falta de información sobre las NPs**. Entre todas las técnicas disponibles (filtración, centrifugación, microscopía, cromatografía, etc...), AF-FFF acoplado a ICP-MS es una de las más prometedoras en el análisis de las NPs, y por lo tanto la seleccionada en nuestro estudio.

A continuación se discuten los resultados observados en los estudios llevados a cabo para la **caracterización y cuantificación de las NPs de TiO_2 empleando AF-FFF-ICP-MS**. En especial, la influencia de los distintos parámetros experimentales e instrumentales durante la optimización de la metodología analítica.

El fraccionamiento de las NPs empleando esta técnica de separación se encuentra influenciado por variables como: las características de la membrana, dimensiones del espaciador, composición de la disolución “*carrier*”, y otras condiciones de separación (volumen de inyección, flujo de separación aplicado “*cross flow*” y tiempo de inyección/focalización). Nuestros estudios fueron llevados a cabo empleando una membrana de celulosa regenerada (RC, *regenerated cellulose*) de tamaño de poro de 10 kDa y un espaciador de 350 μm de espesor. El motivo de seleccionar este tipo de material reside en su carácter hidrofóbico. La membrana RC se considera menos hidrofóbica que otros materiales como polietersulfona (PES, polyethersulfone) o polifluoruro de vinilideno (PVDF, polyvinylidene difluoride), y por lo tanto favorece la recuperación de las NPs. Las dimensiones del espaciador deben seleccionarse en función del tamaño de las NPs. Debido a que las NPs de TiO_2 tienden a aglomerarse y aumentar su tamaño, se pensó que 350 μm sería una medida

adecuada, ya que se encuentra en el intervalo recomendado para partículas de mayor tamaño (desde 250 a 750 μm).

Respecto a la composición de la disolución “*carrier*”, es muy importante llevar a cabo una optimización de sus diferentes componentes como: fuerza iónica, presencia de agentes surfactantes, y valor de pH. La influencia de todos estos parámetros está estrechamente relacionada con las interacciones producidas entre las NPs y la membrana, e incluso con las interacciones entre NPs. En muchos estudios se ha recomendado la adición de electrolitos a la disolución “*carrier*”. En concreto, el uso de cationes monovalentes como Na^+ (NaNO_3 , CH_3COONa) o NH_4^+ (NH_4NO_3 , $\text{CH}_3\text{COONH}_4$), ya que evitan la agregación de muchos tipos de NPs en comparación con el empleo de cationes divalentes como Ca^{2+} ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$). A la hora de seleccionar un valor de fuerza iónica es importante conocer el tipo de estabilización de las NPs. Las NPs estabilizadas electrostáticamente son más sensibles al efecto de la acción de ciertos iones, ya que éstos pueden modificar las fuerzas electrostáticas establecidas entre la NPs y su recubrimiento. En el caso de las NPs de TiO_2 se ha demostrado que un valor de fuerza iónica bajo aumenta la estabilidad de las dispersiones, por lo que en nuestro estudio se decidió prescindir de la adición de electrolitos. Paralelamente, también se ha observado que valores de pH elevados son más adecuados para la estabilización de las NPs de TiO_2 en fase rutilo. Siguiendo los resultados obtenidos por otros autores, el pH fue ajustado a 8.7.

La optimización de todas estas variables fue esencial, sin embargo, el factor clave a la hora de conseguir una buena eficiencia de separación fue el uso de agentes surfactantes. En varios estudios se ha demostrado que el empleo de SDS, FL-70, Triton X-100, o Tween 20 en la disolución “*carrier*”, favorece la separación de las NPs y proporciona mejores recuperaciones. Se seleccionó un porcentaje de SDS del 0.2% (m/V) para llevar a cabo el fraccionamiento de las NPs de TiO_2 . Con esta concentración las interacciones con la membrana fueron mínimas, al igual que la cantidad de NPs que eluían del sistema cuando el “*cross flow*” alcanzaba el valor de cero (conocidas como NPs residuales, resultado de interacciones no específicas). Sin embargo, la adición de estas sustancias también puede tener un efecto negativo en la eficiencia de nebulización cuando AF-FFF es acoplado a ICP-MS. Este efecto negativo ya ha sido observado por otros autores que han trabajado con NPs de Au. En estos trabajos se ha demostrado que el empleo de metanol mejora la eficiencia de nebulización de las NPs. En nuestro estudio, la adición de metanol también resultó ser eficaz ya que además de favorecer la dispersión de las NPs de TiO_2 , su empleo mejoró la resolución de los fractogramas.

El “*cross flow*” es uno de los principales parámetros que influyen en la distribución de las NPs a lo largo de la membrana, y por consiguiente es su separación. Revisando la bibliografía publicada se puede observar que se han empleado distintos valores de “*cross flow*”, desde valores pequeños como 0.3 mL/min, hasta valores mucho más elevados como 2 mL/min. La optimización de este parámetro instrumental requiere especial atención, ya que dependiendo del tipo de NPs los criterios establecidos sobre si un determinado valor de “*cross flow*” es bajo o alto pueden variar. En nuestro caso, y al igual que para otro tipo de NPs inorgánicas, el empleo de flujos elevados conllevó a prolongados tiempos de retención y pérdidas de NPs a lo largo del análisis. Los mejores resultados se obtuvieron empleando una velocidad de flujo de 0.5 mL/min.

El tiempo de inyección/focalización fue el último parámetro instrumental optimizado. Durante esta etapa, las NPs se focalizan en una zona estrecha de la membrana gracias a la influencia de un caudal denominado de focalización. El empleo de tiempos de inyección muy cortos puede dar lugar a picos de “volumen muerto” de mayor intensidad, mientras que tiempos largos provocan largos tiempos de elución. Los mejores resultados fueron obtenidos empleando un tiempo de inyección/focalización de 4 min.

Uno de los problemas más discutidos en los estudios relacionados con AF-FFF es la falta de reproducibilidad y la baja recuperación de los análisis, debido en gran parte a la existencia de interacciones NPs-membrana. En estos casos, se requiere una estabilización previa de la membrana. Esta estabilización se puede lograr a través de varias inyecciones consecutivas de la dispersión de NPs hasta conseguir una saturación de la membrana. De esta manera se consigue modificar la carga superficial de la membrana y se mejora la recuperación. En nuestro estudio, la estabilización de la membrana no fue suficiente para evitar los problemas de recuperación, que finalmente fueron solventados incrementando el porcentaje de metanol del 3% al 6%.

La correcta determinación del tamaño de las NPs es clave a la hora de llevar a cabo su caracterización. Este parámetro, relacionado directamente con su posible toxicidad en los sistemas biológicos. Hasta la fecha, obtener la información correcta sobre la distribución de tamaños de las NPs constituye una cuestión muy relevante en los análisis mediante AF-FFF. Se han propuesto diferentes estrategias para conseguir esta finalidad: la aplicación de las ecuaciones de la teoría de FFF, o el empleo de métodos de calibración con patrones de compuestos y/o NPs de tamaño conocido. Sin embargo, ambos métodos pueden dar lugar a informaciones erróneas ya que no tienen en cuenta posibles cambios en los tiempos de

elución debido a las propiedades físicas o químicas de las NPs, o a las interacciones NPs-membrana. En nuestro estudio se ha demostrado que para determinados tipos de NPs, como es el caso de las NPs de TiO_2 , el empleo de NPs de tamaño conocido (en este caso, NPs de látex) no siempre es adecuado, siendo necesario el empleo de otras técnicas como la microscopía electrónica. Una explicación a este hecho podría ser la diferente morfología entre las NPs de látex (esféricas) y NPs de TiO_2 , y el elevado estado de agregación de estas últimas.

Entre las diferentes estrategias propuestas para la cuantificación de las NPs se encuentran: la cuantificación *off-line* mediante ICP-MS de las fracciones recogidas a la salida del sistema AF-FFF, digestión ácida y posterior análisis mediante ICP-MS, y análisis *on-line* AF-FFF-ICP-MS usando disoluciones patrón de naturaleza iónica adicionadas a la muestra a través de una T mezcladora. Este último procedimiento presenta algunos inconvenientes como por ejemplo las diferentes eficiencias de nebulización entre las NPs y las especies iónicas. Diversos autores han publicado resultados contradictorios en este tema. Así, algunos autores han sugerido que se requiere una mayor energía para la atomización de las NPs en comparación con sus correspondientes iones, mientras que otros han puesto de manifiesto que el comportamiento de las NPs de pequeño tamaño es similar al de los iones. En este trabajo se ha presentado un método de calibración *on-line* basado en AF-FFF-ICP-MS para la cuantificación de NPs de TiO_2 . La novedad de la metodología presentada ha sido el empleo de dispersiones estándar de NPs en fase rutilo para construir la recta de calibración, en lugar de disoluciones de Ti en estado iónico. En un primer momento, se puede pensar que la modificación de los métodos de calibración propuestos por otros autores puede resultar sencilla. Sin embargo, la elevada tendencia que caracteriza a las NPs de TiO_2 para formar agregados convierte a la etapa de preparación de las dispersiones en un paso crítico. Se ha puesto de relieve en varias publicaciones que conseguir la dispersión de las NPs de TiO_2 en partículas individuales sigue siendo un reto. En nuestro trabajo se ha comprobado que el tipo de energía de ultrasonidos utilizada (baño o sonda), afecta al estado de agregación de las NPs, y por consiguiente la a recuperación de las mismas. El empleo de la energía de ultrasonidos focalizada (durante 2 min y al 40% de potencia) nos permitió obtener una respuesta lineal, expresada como área de pico, respecto a la cantidad de NPs inyectada en el sistema, y una buena reproducibilidad respecto a los tiempos de elución y perfiles de los picos.

Durante el desarrollo de esta metodología analítica, y del mismo modo que en los estudios de especiación, fue necesaria la validación de cada una de las etapas del procedimiento de trabajo. En este sentido, lo primero que se evaluó fue la eficiencia del procedimiento usado para la extracción de las NPs de los productos de consumo (crema hidratante, maquillaje,

azúcar glasé y café en crema). La concentración de NPs extraídas analizada mediante FIA-ICP-MS se comparó con la concentración de Ti obtenida tras la mineralización de las muestras. Ambos valores fueron muy similares en el caso de la muestra de crema hidratante, pero no en la muestra de maquillaje. Esto podría ser debido a que no todo el Ti presente en esta muestra se encuentra en forma de NPs, o por otra parte, a la presencia de compuestos orgánicos u otras interferencias de matriz que podrían conllevar a una eficiencia de extracción de tan sólo el 54%. Respecto a los productos alimenticios, a pesar del elevado contenido de Ti total detectado, el análisis de los extractos mediante AF-FFF-ICP-MS no mostró la presencia de NPs. Este hecho probablemente sea debido al tamaño de éstas en este tipo de muestras. Se conoce que la técnica AF-FFF no es adecuada para partículas o agregados mayores de 1 μm , y por lo tanto son necesarios otros métodos de separación como filtración o centrifugación. En las imágenes obtenidas mediante TEM tampoco se detectó la presencia de agregados de TiO_2 , en las muestras de alimentos probablemente debido a la falta de sensibilidad de esta técnica respecto a los niveles de Ti encontrados.

Respecto a la validación del método de calibración propuesto, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de Ti obtenidas tras la digestión ácida de las muestras, en los extractos acuosos analizados por FIA-ICP-MS, y en los extractos acuosos analizados mediante AF-FFF-ICP-MS, empleando el método de calibración *on-line* con estándares de rutilo.

**Biotransformación, Acumulación y Toxicidad de Especies de Selenio.
Caracterización de Nanopartículas.**

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes de esta Tesis Doctoral se resumen a continuación:

1. La **biofortificación agronómica con Se** de las especies *Brassica napus* y *Brassica rapa* ha demostrado un elevado potencial de aumentar **la calidad nutricional** de sus **HCD**, caracterizadas por su elevado contenido en proteínas. Prácticamente todo el **Se asimilado en las semillas se biotransformó a SeMet**, lo que conlleva a un aumento de los niveles de este compuesto en las dietas animales.

2. El Se es capaz de activar las enzimas claves en el mecanismo de asimilación del azufre. Su rápida capacidad para biotransformarse a SeMet dio lugar a un retraso transiente en el crecimiento de la especie *Brassica napus*. Los **bajos niveles de SeMeSeCys** cuantificados en la parte aérea y semillas de esta especie, y la **mutación** detectada en la secuencia de la enzima **SMT**, cuya actividad es esencial frente a la toxicidad en plantas hiper-acumuladoras, plantean **la volatilización de los compuestos de Se** como un **mecanismo de detoxificación alternativo** frente a los elevados niveles de Se.

3. Los niveles de concentración de Hg y As en la especie *Clarias gariepinus* se encontraban por debajo de los valores establecidos como tóxicos, y por lo tanto **no mostraron evidencias de un posible problema de contaminación industrial en la zona de Sagua la Grande, Cuba**. Por otro lado, el hecho de que los **niveles de Se** fueran mucho más **elevados** que los existentes en otros pescados de agua dulce, demostró la **gran capacidad de bioacumulación** de estos pescados.

4. La extracción de las especies de Se de matrices complejas, como son los pescados y mariscos, constituye la etapa más crítica en los estudios de especiación. Se ha demostrado que **optimización de la concentración de urea junto a la acción de la energía de ultrasonidos focalizada** fueron claves para conseguir una **extracción cuantitativa** en un tiempo mínimo de tratamiento. El análisis de los extractos enzimáticos demostró que la mayoría del Se se encontraba unido a moléculas resistentes a la acción de las enzimas proteolíticas, y no como

especies inorgánicas. La **dilución isotópica de “especies-específica”** permitió **validar con éxito la cuantificación** de los niveles de **SeMet** presentes en las muestras.

5. Los principales efectos biológicos de las **NPs de Se en las células de hepatocarcinoma humano HepG2** se pusieron de manifiesto en la **reducción de la viabilidad celular**, y en el **efecto inhibitor** sobre la **proliferación celular** y el **comportamiento invasivo** de estas células. Las NPs de Se fueron asimiladas por las células a través de un mecanismo de endocitosis y se detectaron en vacuolas, mitocondrias y retículos endoplasmáticos. Los análisis de citometría de flujo revelaron la conclusión más importante de este estudio. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la inhibición de la proliferación celular se produjo como resultado de un **bloqueo del ciclo celular en la fase S**, y que el **complejo proteico eIF3** estaba directamente **involucrado en el mecanismo de inhibición**. Éste, es el primer trabajo en el cual se plantea un mecanismo a través de cual las NPs de Se ejerce una función **quimiopreventiva y quimioterapéutica contra ciertos tipos de cáncer**.

6. Tras la optimización de una metodología analítica basada en la técnica de separación **AF⁴ acoplada a ICP-MS** para la **caracterizadas y cuantificadas** de las **NPs de TiO₂**, se demostró que la aplicación de la **energía de ultrasonidos focalizada** a la dispersión de las NPs producía una mejora de la **eficiencia del fraccionamiento y buena reproducibilidad de la recuperación de las TiO₂NPs**. El empleo de la **microscopía electrónica** permitió determinar la **distribución de tamaños** de una manera más precisa que tras la calibración con NPs de tamaño conocido. La conclusión más importante del método desarrollado, es que el empleo de **dispersiones de NPs de TiO₂** como **estándares de calibración**, permitió una **correcta cuantificación de NPs** en las muestras de crema hidratante sin la necesidad de procedimientos más tediosos o uso de disoluciones patrón de naturaleza iónica, que pueden proporcionar resultados menos precisos.

**Biotransformación, Acumulación y Toxicidad de Especies de Selenio.
Caracterización de Nanopartículas.**

ANEXO I

Anexo I. Trabajos de investigación relacionados con la tesis. Desarrollo de metodologías analíticas enfocadas al tratamiento de muestra

La elevada toxicidad de las diferentes formas químicas del mercurio y su baja concentración en muestras biológicas hace necesario el desarrollo de métodos analíticos que permitan su separación, identificación y cuantificación en este tipo de matrices. Como ya se ha comentado a lo largo de esta memoria, la preparación de la muestra es una etapa crucial en los estudios de especiación, ya que idealmente se deben extraer cuantitativamente las especies preservando la integridad de las mismas. Por ello, el objetivo del trabajo presentado en este capítulo (**“Approach for rapid extraction and speciation of mercury using a microtip ultrasonic probe followed by LC-ICP-MS”**. Talanta, 82 (2010) 594) fue desarrollar procedimientos de tratamiento de muestra para la determinación de mercurio y sus especies en muestras biológicas. En el presente estudio se presenta un método rápido y sencillo para la extracción de mercurio en muestras de pescados basado en el uso de hidrólisis ácidas y enzimáticas, y la energía de ultrasonidos producida por una micro-sonda. Para la optimización de las metodologías propuestas se han estudiado distintos medios de extracción (concentración de ácido clorhídrico, tipo de enzima y relación sustrato/enzima, adición de agentes complejantes de mercurio), y diversos parámetros que afectan a la eficiencia de las extracciones (tiempo de sonicación, amplitud del ultrasonido y cantidad de muestra). El contenido de mercurio total se determinó mediante FIA-ICP-MS utilizando como *“carrier”* una disolución con un agente complejante de mercurio, para evitar el conocido *“efecto memoria”*, y la cuantificación de especies se llevó a cabo mediante (RP)LC-ICP-MS. La metodología propuesta se validó mediante comparación de los resultados obtenidos por ambas hidrólisis (ácida y enzimática), y con un material de referencia certificado en MeHg (CRM-463, atún).

Como novedad, el método desarrollado se aplicó con éxito al análisis de mínimas cantidades de muestras biológicas (5 mg). Este hecho supone una enorme ventaja para aquellos casos en los que se dispone de pequeñas cantidades de muestra.

Método para una Rápida Extracción y Especiación de Mercurio, Empleando una micro-Sonda de Ultrasonidos seguido de LC-ICP-MS

“Approach for rapid extraction and speciation of mercury using a microtip ultrasonic probe followed by LC-ICP-MS”

Talanta, 82 (2010) 594.



Approach for rapid extraction and speciation of mercury using a microtip ultrasonic probe followed by LC–ICP–MS

Isabel López, Susana Cuello, Carmen Cámara, Yolanda Madrid*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2010

Received in revised form 29 April 2010

Accepted 10 May 2010

Available online 20 May 2010

Keywords:

Extraction

Ultrasonic probe

2-Mercaptoethanol

Biological samples

Mercury speciation

ABSTRACT

A fast method for mercury extraction from biological samples based on the use of HCl leaching plus different enzymatic hydrolysis (with and without mercury complexing agents), and the use of focussed ultrasounds (2-mm microtip) is here proposed. Total mercury content in several biological samples was determined by FI–ICP–MS using a carrier solution consisting of 0.1% (v/v) HCl, 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol, to avoid memory effect, and 0.15% (w/v) KCl. For mercury speciation a RP18 chromatographic column coupled to ICP–MS was used. A mobile phase consisting of 0.1% (v/v) formic acid, 0.1% (v/v) HFBA, 2% (v/v) methanol, and 0.02% (w/v) mM L-cysteine at pH 2.1 was used for chromatographic separation of the mercury species in the sample extracts. Extraction procedures were validated by using 50 mg of tuna fish tissue CRM-463 ($2.85 \pm 0.16 \text{ mg kg}^{-1}$ for methylmercury). The recoveries obtained were $99 \pm 3\%$ and $93 \pm 1\%$ after acid leaching (HCl 7 M) and enzymatic extraction (15 mg protease type XIV in 2.5% (v/v) 2-mercaptoethanol), respectively. The optimal sonication conditions (5 min of exposure time and 40% of ultrasound amplitude) were applied to 5 mg of CRM-463 ($88 \pm 5\%$), 5 mg of mussel tissue ($81 \pm 11\%$) and to 2 mg of zebra fish embryos ($90 \pm 10\%$) obtaining good recoveries in all cases. Methylmercury was found to be the most abundant Hg specie in all samples. The developed method is simple and rapid (5 min sample treatment); it is suitable for very small samples and does not alter the original form of the mercury species. Thus, it is of special interest in those cases in which validation of the results may often be hampered by lack of sample availability.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Inorganic mercury (Hg^{2+}) and monomethylmercury (CH_3Hg^+) are the two most abundant Hg species generally found in biological samples [1]. Toxicity, biochemical behaviour and transport of mercury in the environment are clearly dependent on its chemical form [2]. In this context, it is well known that organomercurial compounds are more harmful than inorganic mercury. The fact that the latter is biomethylated by aquatic organisms to form methylmercury is the reason why fish constitutes the major source of MeHg for humans [3] (predatory species may preconcentrate 10,000–100,000 times the mercury concentration in water [4]). The most relevant aspects for bioaccumulation are fish size and/or fat content [5,6], the protein affinity mechanisms [7], and the content of dissolved oxygen in the fish habitat [8].

Mercury interacts with proteins and enzymes due to its strong affinity for sulphur, causing organ dysfunction and a devastating effect on the whole central nervous system of human [11]. In spite

that toxicity of EtHg is lower than that of MeHg, both species cause similar symptoms [9,10].

Extraction of mercury species from a complex sample is recognized as one of the most crucial steps before their determination. A successful extraction procedure for speciation analysis requires high extraction efficiency, and more importantly, all original species must keep intact prior to analysis [12]. Various extraction procedures, such as distillation and acid and alkaline extraction, have a tendency to form artificial methylmercury from inorganic mercury during sample preparation [13,14]. To avoid that acid and alkaline digestion or solvent extraction at moderate temperatures and pH are the methods commonly used to extract mercury species from biological tissues [15]. The high affinity of mercury to sulphhydryl groups makes L-cysteine and 2-mercaptoethanol two very useful reagents to extract mercury species in combination with ultrasounds. Several studies have shown that mercury extraction efficiency increases with increasing concentration of 2-mercaptoethanol [12]. Ultrasound-assisted extraction has already been shown as a very promising technique for the extraction of mercury species. In this way, Rio-Segade and Bendicho [16] developed an ultrasound-assisted extraction method using 2 and 4 mol L⁻¹ HCl for mercury speciation in fish tissues.

* Corresponding author. Tel.: +34 913945145; fax: +34 913944329.

E-mail address: ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid).

Furthermore, enzymatic hydrolysis has also been used due to the ability of enzymes to act on specific chemical bonds avoiding alteration of the chemical forms of mercury [17]. Rai et al. employed Protease XIV to extract inorganic mercury and methylmercury species from fish samples [14].

The main aim of this study is the evaluation of the extraction efficiency of both acid leaching and enzymatic hydrolysis (with and without 2-mercaptoethanol) assisted by ultrasounds for mercury determination and speciation in fish tissues samples. An ultrasonic probe has been selected as it drastically decreases the extraction time and has successfully been used for enzymatic hydrolysis of selenium species in a wide range of matrices [18]. The effect of several parameters affecting mercury extraction such as acid concentration, ultrasonic amplitude, sonication time, amount of extractant and sample size (50 and 5 mg) have been evaluated.

The optimized enzymatic hydrolysis with 2-mercaptoethanol have been applied to biological samples including mussels, swordfish and zebra fish embryos. The latter are particular relevant because as living organisms they are considered an excellent alternative model for the OECD 305 bioconcentration test, which is expensive, time consuming and requires the use of at least 108 juvenile or adult fish. These embryos have a similar genetic code to humans but they are not considered as laboratory animals by the Directive 86/609/EEC.

Finally, a chromatographic method for separation of mercury species coupled to ICP-MS have also been developed and validated using tuna fish tissue CRM-463 as reference material.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

Samples for total mercury determination were digested in doubled-walled advanced composite vessels using a 1000 W MSP (microwave sample preparation system) microwave oven (CEM, Matthews, NC, USA). A Vibra cell VCx130 ultrasonic processors (Connecticut, USA) equipped with a titanium 2-mm-diameter microtip and fitted with a high-frequency generator of 130 W at frequency of 20 KHz was used for extracting mercury species. An Eppendorf Centrifuge 5804 R (Hamburg, Germany) F34-6-38 was used for separation of solid residues from the soluble fraction.

A quadrupole ICP-MS Thermo X-Series (Thermo Electron, Winsford, Cheshire, UK) equipped with a Meinhard nebulizer, a Fussel Torch, and an Impact Bead Quartz Spray Chamber cooled by a Peltier system was used for mercury determination. The mass calibration of the ICP-MS instrument was tuned daily with a solution containing $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of Li, Be, Co, Ni, In, Ba, Ce, Pb, Bi and U in 5% (v/v) HNO_3 .

The liquid chromatographic system used for mercury speciation consisted of a PU-2089 LC pump (JASCO, Tokio, Japan) fitted with a six-port injection valve (model 7725i, Rheodyne, Rohner Park, CA, USA) with a 100- μL injection loop and a reversed-phase analytical column (Symmetry Shield RP₁₈ column, 150 mm \times 3.9 mm, 5 μm , Waters). The outlet of the column was directly connected to the nebulizer of an ICP-MS system using PEEK tubing ($\varnothing = 0.13$ mm). The optimal operation conditions and data acquisition parameters are summarized in Table 1.

2.2. Reagents and materials

All reagents used were of analytical grade. H_2O_2 (35%) from Panreac and HNO_3 (65%) from Merck were used for acid digestion of samples. Non-specific protease type XIV, 2-mercaptoethanol, lipase and L-cysteine monohydrochloric (98%) from Sigma (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were used for

Table 1
Operational parameters of the HPLC-ICP-MS system.

Plasma conditions	
Forward power	1250 W
Plasma gas flow rate	15 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	0.73 L min ⁻¹
Nebulizer gas flow rate	0.83 L min ⁻¹
Nebulizer	Meinhard
Spray chamber	Impact Bead Quartz Spray
Measurement parameters	
Acquisition mode	Time resolved analysis
Isotope monitored	²⁰² Hg, ²⁰¹ Hg and ²⁰⁰ Hg
Dwell time per point	200 ms
Replicates	3
HPLC conditions	
Column	Symmetry Shield RP 18 (150 \times 3.9 mm, 5 μm)
Injection volume	100 μL
Column temperature	25 °C
Mobile phase	0.1% (v/v) formic acid, 0.1% (v/v) HFBA, 2% (v/v) methanol, 0.02% (w/v) L-cysteine (pH 2.1)
Elution mode	Isocratic
Flow rate	1 L min ⁻¹

enzymatic hydrolysis. A 50 mM Tris-HCl buffer solution at pH 7.5 from Fluka were used as extractant media. For acid leaching, HCl (37%) from Merck was used.

The carrier solution for total mercury analysis contained KCl from Riedel-de Haën, HCl and 2-mercaptoethanol.

Heptafluorobutyric acid, formic acid, L-cysteine mono hydrochloridic from Sigma and methanol (Scharlau, Barcelona, Spain) were used in the chromatographic mobile phases.

Standard solutions were prepared daily by making appropriated dilutions of a methylmercury chloride stock standard solution of 1000 mg L⁻¹ (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) in methanol (LC grade, Scharlau) with ultra-pure water (18.2 M Ω cm⁻¹) from a Milli-Q water purification system (Millipore, MA, USA). This solution was stored in the dark at -18 °C.

2.3. Mercury speciation by HPLC-ICP-MS

The resulting supernatants from the procedures detailed in Fig. 1 were analyzed by FI-ICP-MS and LC-ICP-MS for determination of total mercury and its species, respectively. The extracts obtained were centrifuged at 7600 rpm for 5 min and the supernatants were filtered through a 0.22 μm membrane before LC-ICP-MS analysis.

Quantification was performed in time resolved analysis mode and the operating conditions of LC-ICP-MS are summarized in Table 1.

The most abundant mercury isotope ²⁰²Hg was used for data evaluation and the analytical precision was verified by replicate measurements (three injections of a single sample). Quantification was based on peak areas by standard addition method. The different extractions methods reported in this work were optimized using the certified reference material, tuna fish tissue CRM-463 ($2.85 \pm 0.16 \mu\text{g g}^{-1}$ methylmercury), from the Community Bureau of Reference of European Commission (BCR).

3. Results and discussion

3.1. Determination of mercury by ICP-MS: memory effect

Determination of total mercury in biological samples using a classic wet digestion method followed by ICP-MS suffered from serious memory effects [12]. Mercury accumulates within the sample introduction system and it is slowly released over time; thus increasing the response signals for the same mercury concentration. This fact results in non-linear calibration curve, need for

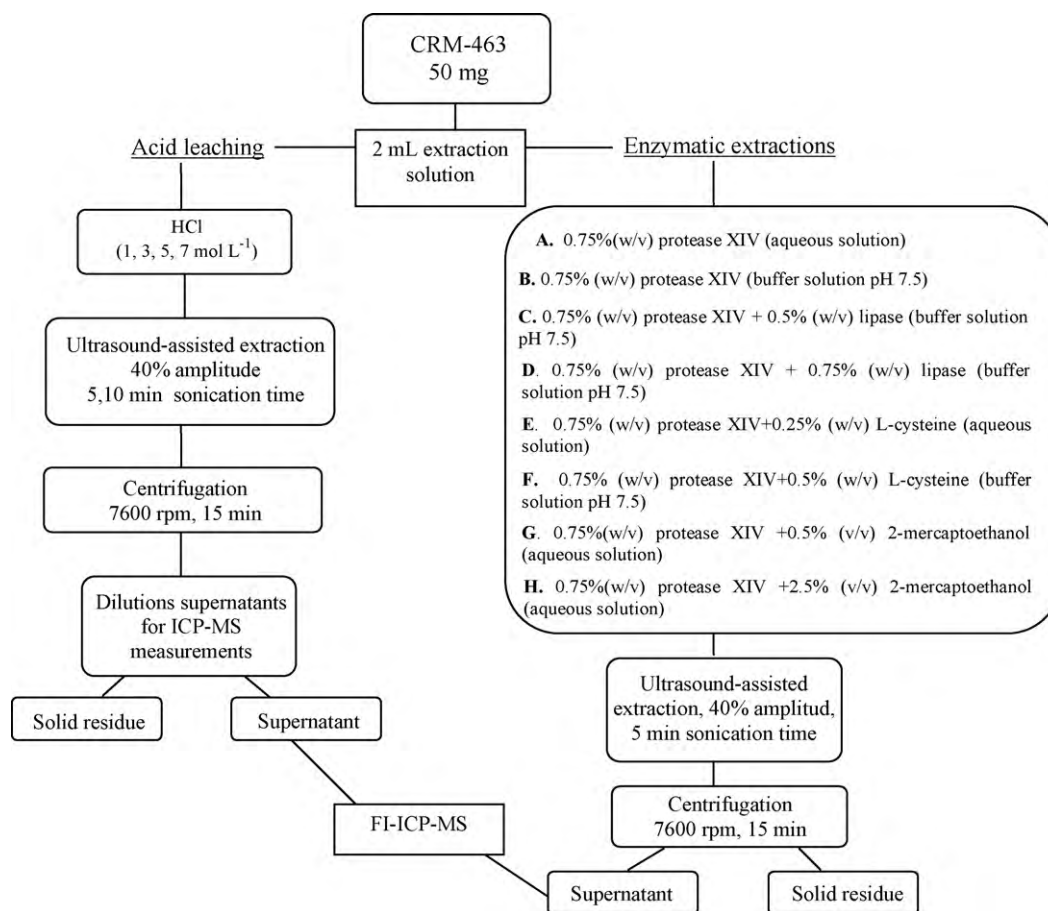


Fig. 1. Scheme showing the different extraction methods used for sample treatment.

long washing times and poor sensitivity [19]. Since the memory effect can be overcome by the addition of Hg(II) ligands [20], a carrier solution containing 0.1% (v/v) HCl, 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol and 0.15% (w/v) KCl was used with this purpose in the present study. HCl was added to the carrier solution in order to maintain the pH at approximately 2, since quantitative analysis of mercury species in biological matrices is favoured at acid medium [12].

3.2. Evaluation of the extraction efficiency

Several extraction procedures based on the use of ultrasonic probe sonication were compared. For this purpose, acid leaching and enzymatic hydrolysis with and without mercury complexing reagents (L-cysteine and 2-mercaptoethanol) were used. In order to optimize the acid leaching, several variables such as concentration of HCl, 1, 3, 5 and 7 mol L⁻¹, ultrasonic amplitude, 40 and 60%, and sonication time, 5 and 10 min, were investigated. In the case of enzymatic extractions several types of enzymes were tested using the optimal ultrasonic parameters found for acid leaching. Besides the extraction of mercury species with 15 mg of protease XIV, several amounts of lipase were added (0.5% (w/v) and 0.75% (w/v)), plus different extraction media such as phosphate buffer solution at pH 7.5 and Tris-HCl buffer solution at pH 7.5. Finally, two mercury complexing reagents, L-cysteine (0.25% (w/v) and 0.5% (w/v)) and 2-mercaptoethanol (0.5% (v/v) and 2.5% (v/v)) were tested to improve the extraction efficiency. Extraction procedures were optimised by using the tuna fish tissue CRM-463 certified for methylmercury. A summary of the different strategies employed is compiled in Fig. 1.

3.2.1. Acid leaching

Acid hydrolysis is one of the most popular methods for mercury extraction [17]. Releasing of protein-bound mercury species with hydrochloric acid has been shown as more efficient than nitric or acetic acid-based leaching [16]. In general, the extraction efficiency is essentially governed by acid concentration, sonication time and ultrasonic amplitude. Thus, four hydrochloric acid concentrations, 1, 3, 5 and 7 mol L⁻¹, were used for sonication during 5 and 10 min at 40 and 60% ultrasonic amplitude. As it has been commented before, optimization of the different parameters was performed using tuna fish tissue CRM-463.

Mercury recovery increases with increasing HCl concentration obtaining a maximum recovery of 99 ± 3% with 7 mol L⁻¹ hydrochloric acid (Fig. 2). These results could be due to the retention of mercury within fish tissue particles at HCl concentration lower than 7 mol L⁻¹. Regarding exposure time, shorter sonication periods have a favourable effect on mercury extraction. Recoveries were considerably lower at a longer exposure time (10 min) as compared to 5 min, which may be caused by volatilization of mercury species due to the creation of the oxidative energy during the sonication process. Thus, 5 min was chosen as optimal treatment time.

Extraction efficiency decreased with increasing amplitude from 40 to 60% (data not shown) because a high vibrational amplitude generates a great number of cavitation bubbles in the solution, which may dampen the passage of ultrasound energy through the liquid.

Based on these results, the optimal conditions found for quantitative extraction of mercury were 7 mol L⁻¹ hydrochloric acid and 5 min of sonication time at 40% ultrasonic amplitude.

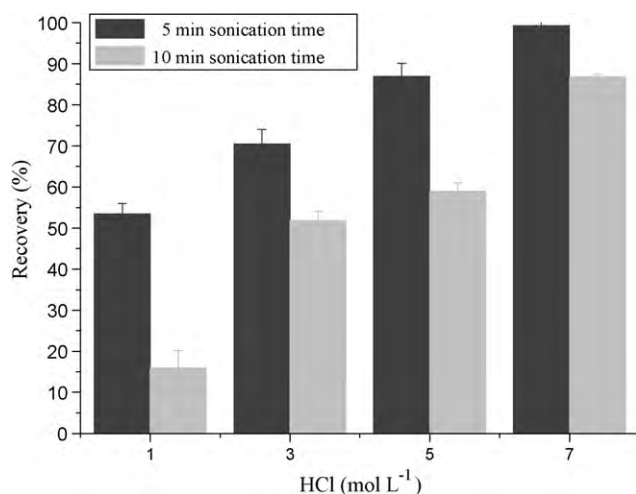


Fig. 2. Effect of hydrochloric acid concentration on the total mercury recovery for 50 mg of sample using 1, 3, 5 and 7 mol L⁻¹ HCl as extractant agent at two sonication times, 5 and 10 min.

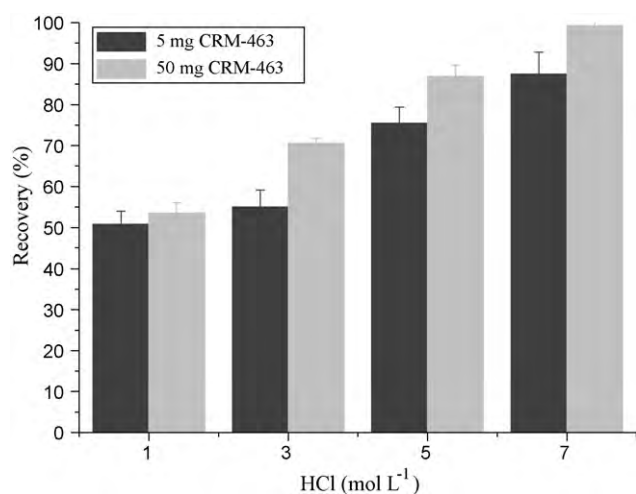


Fig. 3. Comparison of the effect of hydrochloric acid concentration on the total mercury recovery for 5 and 50 mg of sample using 1, 3, 5 and 7 mol L⁻¹ HCl as extractant agent and a sonication time of 5 min.

One of the advantages of ultrasonic probe sonication is its ability to handle small amounts of sample in volumes as low as microliters. For this purpose, the optimised extraction procedure was applied to 5 mg of tuna fish reference material and, as shown in Fig. 3, the mercury recovery from CRM-463 varying the HCL concentration was almost independent of the amount (5–50 mg) of sample used. The recovery of mercury and the precision of the results for 5 mg of samples, $88 \pm 5\%$, were lower than with 50 mg; however, this lower value could be considered satisfactory as it could be attributed to

a lack of homogeneity of CRM-463 when the amount of sample is too small.

3.2.2. Enzymatic extraction

Quantification of mercury by ICP-MS using HCl as extractant reagent suffers of several drawbacks: signal depression, changes in the viscosity of the aspirated solutions, variations on the nebulization efficiency and in aerosol transport [21]. Furthermore, the use of high concentration of HCl hampers the good performance of the ultrasounds tip. Thus, besides the almost quantitative recovery achieved with HCl, different enzymatic mixtures following the procedures detailed in Section 2 were applied. Table 2 shows the recoveries of mercury obtained using different enzymatic extraction assisted by ultrasounds. Recoveries for procedures A–D, only based on enzymatic hydrolysis with protease type XIV, did not reached 40%. In order to improve this value, the use of additional enzymes in the extraction medium, Hg complexing reagents and different conditions were tested: (1) use of lipase enzyme (procedures C and D), due to high lipid content of the fish samples, (2) use of buffer solutions at pH close to 7.5 (procedures C, D and F), for optimal enzyme activity [22] and (3) use of a sulphhydryl reagent (L-cysteine and 2-mercaptoethanol) because its high affinity for mercury. From the results, addition of lipase had a negative effect on the recovery and was not dependent of the amount added (Table 2).

Recovery achieved with the addition of 0.25% (w/v) L-cysteine in aqueous solution or 0.5% (w/v) L-cysteine in buffer solution at pH 7.5 as mercury complexing reagent (procedures E and F) was about 40%. This recovery could be improved by adding HCl to the extraction solution and heating. Hight and Cheng doubled the amount of mercury extracted with the use of heated HCl, until reaching quantitative extraction [23]. Other authors have achieved a quantitative extraction of mercury by using 0.10% (v/v) HCl, 0.05% (m/v) L-cysteine, 0.10% (v/v) 2-mercaptoethanol mixture [24,25], however, the extraction times needed were higher than the 5 min employed in the method developed in this work. The use of 2-mercaptoethanol had, as expected, a positive effect on the recovery. The efficiency increased with higher concentrations. The best recovery ($91 \pm 4\%$) was obtained when the extractant contained 2.5% (v/v) of 2-mercaptoethanol and 0.75% (w/v) of protease type XIV (procedure H). According to De Souza et al., a significant increase in mercury recoveries was observed when using 2-mercaptoethanol instead of L-cysteine [25]. No significant improvement in terms of efficiency was obtained neither by increasing 2-mercaptoethanol percentage (5% (v/v)), nor by applying a second hydrolysis to the solid residue. According to the data shown in Table 2, the most suitable methodology for total mercury extraction was the enzymatic extraction using 2.5% (v/v) of 2-mercaptoethanol and 0.75% (w/v) of protease type XIV. Thus, this procedure was selected for further applications to other fish tissue samples such as mussel and swordfish. To check the applicability of the method to microsample analysis, mercury extraction was carried out in zebra fish embryos (sample size about 2 mg),

Table 2

Extraction of total mercury from CRM-463 ($2.85 \pm 0.16 \mu\text{g g}^{-1}$) using different enzymatic hydrolysis and measured by FI-ICP-MS.

Type enzymatic extraction	Recovery, $\bar{x} \pm s^a$ (%)	
A	0.75% (w/v) Protease type XIV (aqueous solution)	36 ± 2
B	0.75% (w/v) Protease type XIV (Buffer solution pH 7.5)	39 ± 13
C	0.75% (w/v) Protease type XIV + 0.5% (w/v) Lipase (buffer solution pH 7.5)	11.0 ± 0.2
D	0.75% (w/v) Protease type XIV + 0.75% (w/v) Lipase (buffer solution pH 7.5)	5 ± 1
E	0.75% (w/v) Protease type XIV + 0.25% (w/v) L-cysteine (aqueous solution)	40 ± 3
F	0.75% (w/v) Protease type XIV + 0.5% (w/v) L-cysteine (buffer solution pH 7.5)	41 ± 2
G	0.75% (w/v) Protease type XIV + 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol (aqueous solution)	80 ± 1
H	0.75% (w/v) Protease type XIV + 2.5% (v/v) 2-mercaptoethanol (aqueous solution)	91 ± 4

^a Average value \pm standard deviation ($n=3$).

Table 3
Results of total mercury measurements by FI-ICP-MS.

Biological sample	Acid digestion, $x \pm s^a$ (mg Hg kg ⁻¹ sample)	Enzymatic hydrolysis with 2- mercaptoethanol, $x \pm s^a$ (mg Hg kg ⁻¹ sample)	Recovery [*] , $x \pm s^a$ (%)
Mussel (50 mg)	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.04	89 ± 6
Mussel (5 mg)		0.15 ± 0.02	81 ± 11
Swordfish (50 mg)	0.47 ± 0.01	0.39 ± 0.02	83 ± 4
Zebra fish (2 mg)	4.5 ± 0.6	4.0 ± 0.6	90 ± 10

^{*} Recovery of total mercury obtained after enzymatic hydrolysis as compared to acid digestion.

^a Average value ± standard deviation ($n = 3$).

incubated with 200 µg L⁻¹ of methylmercury, and mussel tissue (sample size about 5 mg). The results obtained are shown in Table 3. The contents of mercury in samples (even microsamples) treated by enzymatic hydrolysis were in good agreement with those obtained by a classical acid digestion treatment. As expected, the precision of the results when using microsamples (a few mg) was lower, than that obtained when using higher amounts of sample.

3.3. Mercury speciation by HPLC–ICP-MS

The results showed before demonstrate the suitability of using of ultrasonic probe sonication (2 mm microtip) for the rapid and efficient extraction of mercury from fish tissues of different nature and sample size. However, since species interconversion caused by ultrasonication has been reported for several authors [26], the extracts resulting from enzymatic hydrolysis with 2-

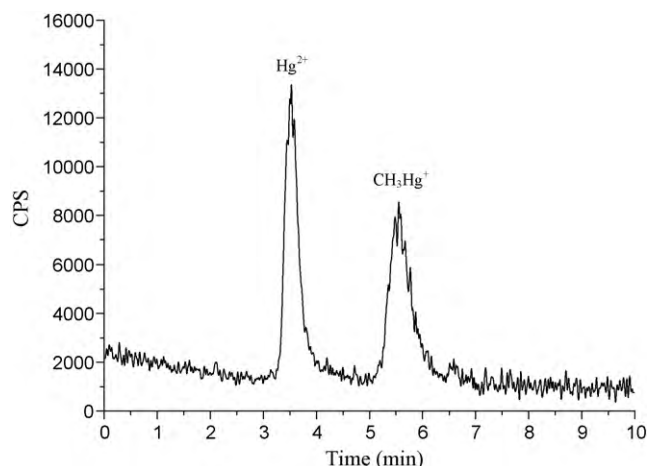


Fig. 4. Chromatogram obtained for 50 µg L⁻¹ of Hg²⁺ and MeHg⁺ standards using reverse phase chromatography and ICP-MS.

mercaptoethanol were analysed by LC–ICP-MS. Based on previous works published in the literature [27], the chromatographic column selected was a reverse phase column (Symmetry Shield RP18, 150 mm × 3.9 mm, 5 µm) and the mobile phase used contained 0.1% (v/v) formic acid, 0.1% (v/v) HFBA, 0.02% (w/v) L-cysteine and 2% (v/v) methanol. The addition of 0.02% (w/v) L-cysteine to the mobile phase was found to be critical in preventing retention of mercury in the reverse phase column and long tailing in the ICP-MS [28] chromatographic peaks. As it can be seen in the elution profiles of methylmercury and inorganic mercury standards shown in Fig. 4 (using separation conditions given

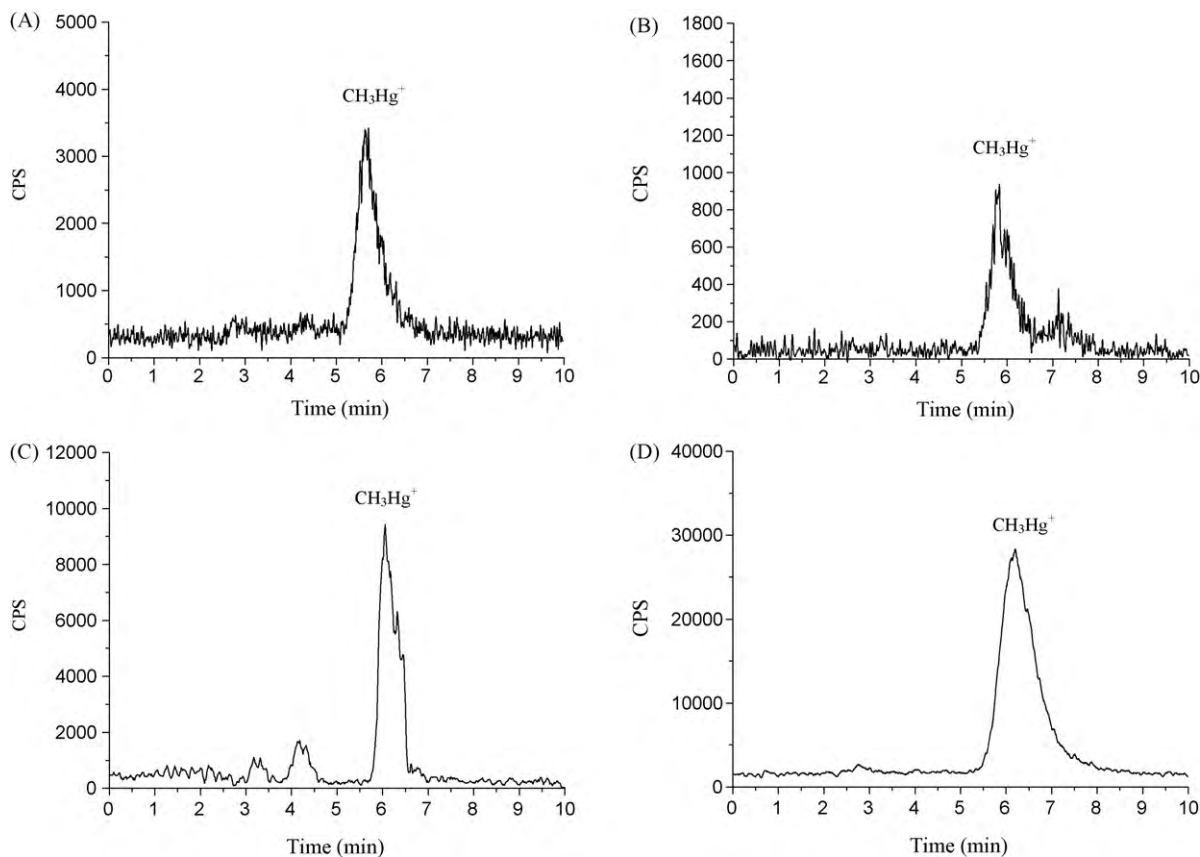


Fig. 5. Chromatograms of mercury species found in (A) tuna fish CRM-463, (B) mussel, (C) swordfish tissue, and (D) zebra fish embryos using reverse phase chromatography coupled to ICP-MS.

in Table 1), separation of Hg species is very fast; it only takes around 7 min.

Chromatographic analyses were performed on enzymatic extracts of tuna fish CRM-463, mussel and swordfish tissue and zebra fish embryos. The chromatograms obtained (Fig. 5(A)–(D)) showed a single peak in each of the evaluated sample, which was identified (by spiking the extract) as MeHg⁺.

The chromatographic profile of the CRM-463 revealed that interconversion of methylmercury did not occur during ultrasound-assisted extraction of mercury species. As expected, the main mercury specie found in all the analyzed samples was MeHg⁺, which is in good agreement with the studies reported by Cabañero et al. [29]. This may be explained due to the MeHg biomagnification phenomena through the trophic chain and the high affinity of fish intestine wall toward MeHg absorption [30]. Moreover, the selected methods allow extraction of mercury species in a few minutes from small size samples.

4. Conclusions

Quantitative extraction of mercury has been achieved using enzymatic extraction (15 mg protease XIV) plus 2.5% (v/v) 2-mercaptoethanol as complexing agent for mercury combined with the use of a titanium ultrasonic probe of 2 mm. The developed method is simple and rapid (10 min sample treatment), and no transformations between mercury species were detected. One novelty of the procedure is its ability to be applied to small size samples, which is significantly relevant for those cases in which big amounts of samples are not available or when they are highly valuable.

Acknowledgments

The authors want to thank the Spanish Government for financial support through the projects: CTQ-2008-05925 and CTQ2008-01031-BQU and Ministerio de Medio Ambiente 046/PC08/2-14.4. I. López thanks the Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid and the European Social Fund for funding through the programme “Contrato de Personal de Investigación de Apoyo” (Project S-0505/AGR/0312). S. Cuello thanks to

Ministerio de Ciencia e Innovación for the FPU predoctoral fellowship.

References

- [1] M. Leemarkers, W. Baeyens, P. Quevauviller, M. Horvat, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 383.
- [2] W. Baeyens, *Trends Anal. Chem.* 11 (1992) 245.
- [3] D.S. Forsyth, V. Casey, R.W. Dabeka, A. McKenzie, *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 849.
- [4] World Health Organization, Geneva. *Environmental Health Criteria, Methylmercury*, 101, ICPS (1990).
- [5] P. Larsens, M. Leemarkers, W. Naeyens, *Waters Air Soil Pollut.* 56 (1991) 103.
- [6] T.M. Grieb, C.T. Briscoll, S.P. Gloss, C.L. Schofield, G.L. Bowie, D.B. Pordello, *Environ. Toxicol. Chem.* 9 (1990) 919.
- [7] N.S. Bloom, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49 (1992) 1010.
- [8] R.P. Mason, W.F. Fitzgerald, *Nature* 347 (1990) 457.
- [9] K. Eto, *Toxicol. Pathol.* 25 (1997) 614.
- [10] J.R. Peralta-Videa, M.L. Lopez, M. Narayan, G. Saupe-Torresdey, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1665.
- [11] J.L. Capelo, C. Maduro, A.M. Mota, *Ultrason. Sonochem.* 13 (2006) 98.
- [12] W. Meng, F. Weiyue, S. Junwen, Z. Fang, W. Bing, Z. Motao, L. Bai, Z. Yuliang, C. Zhifang, *Talanta* 71 (2007) 2034.
- [13] H. Hintelmann, R. Falter, G. Ilgen, R.D. Evans, *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 363.
- [14] A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 17 (2002) 1595.
- [15] R. Rai, W. Maher, F. Kirkowa, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 12 (2002) 1560.
- [16] S. Rio-Segade, C. Bendicho, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 14 (1999) 263.
- [17] L.H. Reyes, G.M. Mizanur Rahman, T. Fahrenholz, H.M. Skip Kingston, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 2123.
- [18] Z. Pedrero, Y. Madrid, H. Hartikainen, C. Cámara, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 266.
- [19] C.F. Harrington, S.A. Merson, T.M.D. DÍSilva, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 247.
- [20] X. Zhu, S.D. Alexandratos, *Microchem. J.* 86 (2007) 37.
- [21] L. Jian, W. Goessler, K.J. Irgolic, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 48.
- [22] G. Vale, R. Rial-Otero, A. Mota, L. Fonseca, J.L. Capelo, *Talanta* 75 (2008) 872.
- [23] S.C. Hight, J. Cheng, *Anal. Chim. Acta* 567 (2006) 160.
- [24] J.L. Rodrigues, S.S. de Souza, V.C. de Oliveira Souza, F. Barbosa, *Talanta* 80 (2010) 1158.
- [25] S.S. De Souza, J.L. Rodrigues, V.C. de Oliveira Souza, F. Barbosa, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 25 (2010) 79.
- [26] Z. Pedrero, J. Ruiz-Encinar, Y. Madrid, C. Cámara, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 22 (2007) 1061.
- [27] L. Yu-Feng, C. Chuying, L. Bai, W. Qing, W. Jiangxue, G. Yuxi, Z. Yuliang, C. Zhifang, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 22 (2007) 925.
- [28] W. Chem, P. Wee, I.D. Brindle, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 15 (2000) 409.
- [29] A.I. Cabañero, C. Carvalho, Y. Madrid, C. Batoréu, C. Cámara, *Biol. Trace Elem. Res.* 103 (2005) 17.
- [30] F.M. Morel, A.M.L. Kraepiel, M. Amyot, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29 (1998) 543.

**Biotransformación, Acumulación y Toxicidad de Especies de Selenio.
Caracterización de Nanopartículas.**

ANEXO II

GLOSARIO DE TÉRMINOS

AE: intercambio aniónico

AF-FFF: fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico

AFM: microscopía de fuerza iónica

BSA: Albúmina de suero bovino

CE: Electroforesis capilar

CLM: microscopía con láser confocal

CNTs: nanotubos de carbono

CS: chitosan

DIOs: iodotironina deiodinasa

DLS: dispersión de luz dinámica

DMDS₂: dimetildiseleniuro

DMS₂: dimetilseleniuro

EDS: espectroscopia de rayos X

EPA: Agencia de Protección Ambiental

ESI-MS: espectrometría de masas de ionización por electrospray

ESS: eucheuma striatum sulfatada

FC: citometría de flujo

FDA: Administración de comida y medicamentos

FM: Microscopía de Fluorescencia

GC: cromatografía de gases

GPx glutationa peroxidasa

HG-AAS: espectroscopia de absorción atómica mediante generación de hidruros

HG-AFS: espectroscopia de fluorescencia atómica mediante generación de hidruros

H₂Se: seleniuro de hidrógeno

HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficacia

ICAT: Cuantificación y análisis de la expresión de proteínas mediante marcaje isotópico

ICP-MS: espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo

ICP-OES: espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo

ID: yodotiroina deyodinasas

IDA: análisis por dilución isotópica

IP: yoduro de propidio

iTRAQ: Cuantificación y análisis de la expresión de proteínas mediante marcaje isobárico

MALDI-TOF: espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz

MALLS: láser multi-ángulo de dispersión de luz

MDA: malondialdehído

MeHg: metilmercurio

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio de bromo

QDs: Quantum Dots

ROS: especies reactivas de oxígeno

RP: fase inversa

SEC: cromatografía de exclusión molecular

Se(VI): seleniato

Se(IV): selenito

SeCys: selenocisteína

SeCys₂: selenocistina

SEM: microscopía electrónica de barrido

SeMeSeCys: selenometilselenocisteína

SeMet: selenometionina

SeO₂: dióxido de selenio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante

SILAC: marcaje isotópico estable de los aminoácidos en cultivo celular

TEM: microscopía electrónica de transmisión

TMSe⁺: trimetilseleniuro

TRx: tioredoxina reductasa