

Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vílchez
Martín”



**Estudio de elementos esenciales y tóxicos en microalgas
: uso de *Chlorella sorokiniana* en la preparación de
alimentos funcionales**

**Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:**

Verónica Gómez Jacinto

Fecha de lectura: 30 de octubre de 2015

Bajo la dirección de los doctores:

José Luis Gómez Ariza

Tamara García Barrera

Huelva, 2015





Universidad
de Huelva

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

DEPARTAMENTO DE QUIMICA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES
“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”

**ESTUDIO DE ELEMENTOS ESENCIALES Y
TÓXICOS EN MICROALGAS. USO DE *Chlorella*
sorokiniana EN LA PREPARACIÓN DE
ALIMENTOS FUNCIONALES**

Programa de Doctorado:

Técnicas Instrumentales en Químicas

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR:

VERÓNICA GÓMEZ JACINTO

Directores:

Dr. José Luis Gómez Ariza

Dra. Tamara García Barrera

**ESTUDIOS DE ELEMENTOS ESENCIALES Y
TÓXICOS EN MICROALGAS. USO DE *Chlorella
sorokiniana* EN LA PREPARACIÓN DE
ALIMENTOS FUNCIONALES**

Directores:

Fdo.: *José Luis Gómez Ariza*

Fdo.: *Tamara García Barrera*

CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD

PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD



**Universidad
de Huelva**

UNIVERSIDAD DE HUELVA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

DEPARTAMENTO DE QUIMICA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES

“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”

**TRABAJO PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR LA LICENCIADA:**

Fdo.: *Verónica Gómez Jacinto*

D. JOSÉ LUIS GÓMEZ ARIZA. Catedrático de Universidad y director del Departamento de Química y Ciencia de los Materiales “Profesor José Carlos Vilchez Martín” de la Universidad de Huelva.

HACE CONSTAR QUE:

El presente trabajo de investigación, titulado “ESTUDIOS DE ELEMENTOS ESENCIALES Y TÓXICOS EN MICROALGAS. USO DE *Chlorella sorokiniana* EN LA PREPARACIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES”, realizado por Dña. Verónica Gómez Jacinto, bajo la dirección del Prof. José Luis Gómez Ariza y la Prof. Tamara García Barrera, reúne los requisitos necesarios para ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Química y Ciencia de los Materiales “Prof. J.C. Vilchez Martín” de la Universidad de Huelva.

Huelva, Junio de 2015

Fdo. José Luis Gómez Ariza

Agradecimientos

En primer lugar quisiera empezar agradeciendo a mis Directores de Tesis, José Luis Gómez Ariza y Tamara García Barrera, por la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación de la Universidad de Huelva “Análisis Medioambiental y Bioanálisis”. Habéis sido y seréis un ejemplo siempre, me habéis enseñado todo lo que se de este mundo, con dedicación, constancia y esfuerzo. Me habéis animado cuando el camino se ponía difícil, por todo ello, no puedo encontrar suficientes palabras para agradeceros todo lo que habéis hecho, sobre todo en el campo de lo personal y también en lo emocional. Gracias mil veces.

Agradezco al Ministerio de Economía y Competitividad por la concesión de una beca de personal investigador en formación, ya que sin este medio de financiación no hubiera sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A su vez tengo que agradecer fuertemente a la Prof. Inés Garbayo y Prof. Carlos Vilchez por vuestra aportación a esta Tesis en la parte de los cultivos de microalgas. Habéis sido unos grandes compañeros, siempre ayudando y siempre dispuestos. Vuestros valiosos consejos y sugerencias han ofrecido una colaboración siempre enriquecedora y gratificante. Al Prof. Francisco Navarro por su inestimable colaboración, ayuda y orientación en la experiencia con los ratones.

También quisiera agradecer a la Prof. Eva Krupp y Prof. Jorg Feldmann por darme la oportunidad de permanecer en su grupo de investigación durante 6 meses, donde he podido desarrollar mis conocimientos científicos, así como sus valiosas sugerencias y discusiones científicas. A todos mis compañeros de TESLA, por todo el cariño, atención y ayuda que me habéis brindado desde el primer día que llegué a Aberdeen, haciéndome sentir como si estuviera en casa. Thank you very much because I made great friends.

Como no podía ser menos, quiero dar las gracias a todos mis compañeros del laboratorio que estuvieron y a los que están: Fernando Moreno, Jose Manuel Manso, Rocío Castilla, Miguel Ángel García, Raúl González, Amanda Gago, Manolo Contreras, Rocío Jara, Belén Callejón, Gema Rodríguez. Gracias por vuestra compañía en la labor experimental, por hacer más amenas las horas de trabajo, por aguantar mis momentos malos y buenos, habéis sido grandes compañeros tanto dentro como fuera de este laboratorio. Quiero hacer una especial alusión a Jessica Vélez y Macarena González. Por todas esas charlas, risas, bailes, y demás momentos que he tenido la suerte de compartir con ustedes. También quiero expresar mi más sincera gratitud a las compañeras del laboratorio de Biotecnología de microalgas por vuestra inestimable colaboración, ayuda y orientación en los cultivos. En especial a Marta de la Vega, eres especial, gracias por tu amistad. A Lourdes Maestre, mi inorgánica preferida, por tu verdadera amistad.

También quiero agradecer a todas mis amigas, Ángela, Belén, Leticia, Cristina, Celia, Vero, Gracia, Pilar, M^a José, Ana Molina, por ofrecerme esa verdadera amistad de tantos años. Por ser un apoyo indispensable, animándome a seguir adelante y por interesarse siempre por esta tesis, aunque llegara a convertirse en mi monotema. Gracias de corazón.

Por último y más importante, esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de las personas más importantes de mi vida, mi familia. A mis padres, Jesús y Justi, gracias por guiarme en todos mis caminos, por esforzaros tanto, tanto... para que pudiera estar hoy escribiendo estas líneas. Nunca podré agradeceros vuestra ayuda, es tan difícil... Gracias por permitirme ser quien quería ser. Gracias por los valores de vida tan importantes que me habéis inculcado como el amor desinteresado, el espíritu de trabajo, esfuerzo y sacrificio. Gracias por ser unos padres tan especiales. A mi hermano, Jesús, eres y serás siempre especial. Gracias por tantos momentos felices que me brindas,

porque eres el mejor regalo que unos padres pueden dar. Porque haces que llore riendo y ría llorando. Te quiero. Y en especial a mi pareja, Juan José. Gracias por comprender mi profesión, por acompañarme tantas noches en el laboratorio, por aceptar mis ausencias en mi salidas de congresos, y por ofrecerme siempre tu mejor sonrisa cuando llegaba a casa. Gracias por aguantar mi mal humor en los momentos difíciles y por ayudarme cuando me hundía. Gracias por ser el responsable de mi felicidad, Te quiero. Especialmente a mis abuelos, Antonio y Justa, sois y seréis mi guía, me habéis enseñado a no rendirme nunca y a aceptar las dificultades con entusiasmo y coraje. Hoy y siempre estaréis en mi memoria, os quiero. A mis suegros y cuñadas, una familia admirable que la vida me ha regalado, gracias por todos esos ánimos para seguir adelante. Gracias de corazón. A Pepe y a Teresa, por sentirme como una nieta más, por vuestro cariño y ayuda en todo momento.

Cuando alguien nos regala su tiempo, nos está regalando lo único que no recuperará jamás.

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	3
OBJETIVOS/OBJETIVES	9
INTRODUCCIÓN	13
I. Elementos esenciales y tóxicos	15
I.1. Selenio: Elemento esencial para los seres vivos	18
I.1.1. Metabolismo del selenio en mamíferos	19
I.1.2. Factor clave en la esencialidad: Selenoproteínas	23
I.1.3. Implicaciones biológicas de las especies químicas del selenio: Efecto protector	26
I.1.4. Selenio en alimentos y bioaccesibilidad	29
I.1.5. Toxicidad por excesiva ingesta de selenio: Selenosis	33
I.2. Yodo: Elemento esencial para los seres vivos	34
I.2.1. Absorción y metabolismo del yodo	35
I.2.2. Problemas relacionados con su deficiencia	37
I.2.3. Yodo en alimentos	38
I.3. Mercurio: Elemento tóxico para los seres vivos	39
I.3.1. Importancia toxicológica del mercurio y sus derivados	40
I.3.2. Exposición a través de la dieta: Bioacumulación	42
I.3.3. Efecto antagonista selenio-mercurio	44
II. Microalgas	47
II.1. Microalgas en la nutrición	49
II.1.1. Microalgas en la nutrición animal	51
II.2. Microalgas como sistema modelo de procesos biológicos	52
II.2.1. Mecanismos de tolerancia a metales de los microorganismos y microalgas a los metales	53
II.2.1.1. Moléculas quelatantes de metales pesados: Fitoquelatinas	57
II.2.2. Exposición de <i>Chlorella sorokiniana</i> a mercurio	59

III. Desarrollo de alimentos funcionales	61
III.1. Alimento funcional	61
III.2. La microalga <i>Chlorella</i> como alimento funcional	63
III.2.1. La microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> enriquecida en yodo como alimento funcional	64
III.2.2. La microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> enriquecida en selenio como alimento funcional	67
III.2.2.1. Bioacumulación y biotransformación de selenio en microalgas	68
IV. Especiación química, metalómica y metabolómica	71
IV.1. Características del análisis de especiación química y metalómica	74
V. Metodologías analíticas en metalómica	78
V.1. Espectrometría de masas molecular para la determinación de los complejos metal-biomoléculas	81
V.2. Separación cromatográfica en análisis metalómicos	84
V.3. Estudios metalómicos y de especiación química en microalgas y macroalgas	86
VI. Metodologías analíticas para estudios metabolómicos	89
VI.1. Estudios metabolómicos de microalgas y macroalgas	92
PARTE EXPERIMENTAL	99
I. Instrumentación analítica	99
I.1. Instrumentación empleada para los ensayos bioquímicos de microalgas	99
I.2. Instrumentación empleada para la preparación de muestras	99
I.3. Instrumentación empleada para las separaciones cromatográficas	100
I.4. Espectrómetro de masas atómico	101
I.5. Espectrómetro de masas moleculares	103
II. Reactivos y disoluciones patrón	104
III. Procedimientos experimentales	106
III.1. Cultivos de microalgas en el laboratorio	106
III.1.1. Métodos cuantitativos para medir el crecimiento de las colonias de células	107

III.1.1.1. Determinación del peso seco y conteo de células	107
III.1.1.2. Determinación de la actividad fotosintética	108
III.1.1.3. Determinación del contenido de clorofila y carotenoides	108
III.2. Experiencias de exposición de <i>Chlorella</i> a elementos de importancia toxicológica o esencial	109
III.2.1. Experiencia de exposición a yodo	109
III.2.2. Experiencia de exposición a selenio	113
III.2.3. Experiencia de exposición a mercurio	115
III.2.4. Estudios de exposición a mercurio y selenio	117
III.3. Evaluación de la biodisponibilidad de selenio en <i>Chlorella sorokiniana</i> enriquecida en selenio tras una digestión gastrointestinal “ <i>in vitro</i> ”	120
III.4. Uso de la microalga <i>Chlorella</i> enriquecida en selenio como alimento en el ratón de laboratorio <i>Mus musculus</i>	121
III.4.1. Manipulación de los animales de experimentación	122
III.4.2. Determinación multielemental en suero y tejidos	122
III.4.3. Preparación de extractos citosólicos para estudios metalómicos	123
III.4.4. Cuantificación de selenoproteínas en suero mediante HPLC-ICP-MS	123
III.4.5. Estudio metabolómico en suero e hígado de ratón	124
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	127
Capítulo I. Especiación de yodo en la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> enriquecida en este elemento en el medio de cultivo	129
Capítulo II. Especiación de selenio en la microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> enriquecida en este elemento en el medio de cultivo.	143
Capítulo III. Estudio de la respuesta biológica de la microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> a la exposición a mercurio inorgánico.	185
Capítulo IV. Estudio del efecto protector de la selenometionina sobre la toxicidad por metilmercurio en <i>Chlorella sorokiniana</i>	229
Capítulo V. Estudio de la biodisponibilidad “ <i>in vitro</i> ” del Se en la microalga <i>C. Sorokiniana</i> enriquecida en Se. Estudio metalómico y metabolómico “ <i>in vivo</i> ” en ratones alimentados con la microalga <i>C. sorokiniana</i> enriquecida en Se.	261

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	317
BIBLIOGRAFÍA	327
ANEXOS	371

Resumen/Summary

Las microalgas han despertado un enorme interés al tratarse de microorganismos que combinan de forma equilibrada una eficiente fotosíntesis oxigénica, con requerimientos nutricionales sencillos y grandes capacidades biotecnológicas unidas a su estructura celular sencilla, alta tasa de crecimiento, que les permite duplicar varias veces el número de células en un corto espacio de tiempo, así como la capacidad para producir y acumular metabolitos de interés. Se trata de microorganismos muy fácilmente manejables bajo condiciones de laboratorio, que pueden ser utilizadas como modelo vegetal para la investigación de las distintas rutas metabólicas. Esta combinación de célula vegetal y microorganismo de rápido crecimiento ha determinado su selección para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

En los últimos años, existe un especial interés por los alimentos que no sólo tengan valor nutritivo sino que además aporten un efecto beneficioso para la salud. En este sentido surge la producción de alimentos funcionales que con nuevas aproximaciones tecnológicas está logrando productos de alto valor añadido, muy bien caracterizados y en los que los aspectos toxicológicos, nutricionales y metabólicos están perfectamente establecidos y controlados. Recientemente se ha destacado las posibilidades que presentan las algas como fuente de sustancias funcionales y como base para la producción de suplementos alimentarios y en particular de compuestos de selenio, elemento con demostradas propiedades terapéuticas en la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares, del sistema inmune y problemas neurológicos. Las nuevas tecnologías analíticas, en particular el empleo de procedimientos de especiación basados en acoplamientos HPLC-ICP-MS y las técnicas de extracción de especies químicas rápidas y eficaces junto a procedimientos de confirmación de sustancias basados en HPLC-MS-MS o técnicas de masas en tandem (QqQ y Q-TOF), están abriendo nuevas posibilidades en el estudio y caracterización de estos productos. Asimismo, el desarrollo de técnicas metalómicas que utilizan cromatografía multidimensional (SEC-HPLC) y detección ICP-MS, con identificación de metalobiomoléculas por ESI-QqQ-TOF-MS, constituyen herramientas muy poderosas e innovadoras que pueden impulsar los desarrollos biotecnológicos.

El presente estudio se centra en la microalga *Chlorella* destinada al consumo humano y animal, para hacer el seguimiento de los procesos de bioacumulación de yodo y selenio, las formas y especies químicas que se producen, así como el metabolismo que lo acompaña. De esta forma se controla de manera muy eficiente, la producción de especies bioactivas, la aparición de sustancias tóxicas indeseables y el

rendimiento global del proceso hasta alcanzar las condiciones óptimas de producción. En paralelo al estudio analítico se desarrolló y optimizó el proceso biotecnológico a nivel de laboratorio, determinándose los límites de tolerancia de estos elementos esenciales a la microalga objeto de estudio, el perfil de distribución del elemento en las macromoléculas celulares, junto al desarrollo de estrategias biotecnológicas adecuadas para la estimulación de la acumulación de éstos. Debido a la facilidad de incorporación de selenio y su alto contenido de selenometionina, convierte a esta microalga en una prometedora candidata para la producción de un alimento funcional rico en dicho elemento.

En base a los resultados obtenidos, para conocer la biodisponibilidad del elemento, se empleó un método de bioaccesibilidad *in vitro* de microalgas enriquecidas en selenio mediante métodos que simulan la digestión gastrointestinal. Asimismo, se han llevado a cabo experiencias de exposición *in vivo* del ratón *Mus musculus* a microalgas enriquecidas en selenio. Para ello se ha aplicado un procedimiento metalómico a los extractos citosólicos de diferentes órganos y suero de *Mus musculus*, con objeto de identificar posibles cambios de expresión de metabiomoléculas asociadas a una dieta rica en Se.

Por otro lado, al tratarse de un organismo unicelular, la *Chlorella* posee un metabolismo más sencillo que permite realizar de forma simplificada ensayos de exposición a elementos tóxicos, extrapolables, posteriormente a organismos más complejos. Lo que convierte a esta microalga en un bioindicador muy adecuado para estudios de toxicidad, contaminación ambiental, así como efectos antagonistas e interacciones entre contaminantes y sustancias protectoras. En este sentido, se ha desarrollado en la presente Tesis un estudio de exposición a mercurio inorgánico, con objeto de determinar las especies y metabolitos metálicos que se originan y las interacciones entre ellos. Comprobándose que el selenio podría contrarrestar la toxicidad del mercurio, como se ha demostrado en las experiencias de alga a metilmercurio y selenometionina, prestando especial atención al posible efecto de la quiralidad de la selenometionina en la reducción del efecto tóxico del mercurio orgánico.

Microalgae have a great interest because they combine photosynthetic activity with nutritional requirements and biotechnological potentiality, which together with a simple cellular structure and high growth rate allow multiplying several times the number of cells in a short period of time, accumulating valuable metabolites. They are easy manipulated microorganisms in the laboratory and can be used as vegetal models for metabolic pathways research. This combination of vegetal cell with fast growing microorganism has promoted their use as the choice of them for the different aims of this PhD Thesis.

In recent years, there is a special interest in foods that are not only nutritious but also provide a beneficial health effect. In this way has emerged functional food production based on recent technologic approximations with high added value, well characterized with defined toxicological, nutritional and metabolic profiles. Recently, it has been highlighted the potential of algae as functional substances source and particularly selenium compounds, element with high therapeutic properties in cancer prevention, cardiovascular diseases, immune systems, and neurological impairments.

New analytical technologies, particularly speciation approaches based on HPLC-ICP-MS couplings and fast extraction techniques for chemical species together with confirmatory approaches for chemical substances based on HPLC-MS-MS or tandem mass spectroscopic techniques (QqQ y QqTOF), are open new alternatives for unknown compounds characterization. In addition, the development of metallomic techniques based on multidimensional chromatographic (SEC/HPLC) and ICP-MS detection allows the identification of metallo-biomolecules combined with ESI-Qq-TOF-MS, which are very powerful and innovative tools for biotechnological developments.

Present study considers the possible use of microalgae *Chlorella sorokiniana* for human and animal consumption, considering the possible bioaccumulation of iodine and selenium and the chemical forms of these elements produced by the algae, as well as the associated metabolism to control the production of bioactive species and formation of undesirable toxic substances as well as the global process yielding to get optimum conditions of production.

Parallel to analytical study was optimized the biotechnological process at laboratory scale, to establish tolerance limits of these essential elements for the algae, the distribution profile of the element

among cell macromolecules, together to improvement of biotechnological strategies for element accumulation enhancement.

Due to the easy incorporation of selenium by the microalgae and high content of selenomethionine this algae is a promising candidate to produce a functional food enriched in this element.

In order to results to establish selenium bioavailability, an *in vitro* approach was used to access microalgae selenium bioaccessibility using algae enriched in this element by simulation of gastrointestinal digestion. Further, *in vivo* exposure experiences to enriched microalgae were performed on mice *Mus musculus*. For this purpose it has been applied a metallomic approach to cytosolic extracts from organs and serum of *Mus musculus*, in order to identify expression changes of metallobiomecules associated to a diet rich in selenium.

On the other hand, because it is a unicellular organism, *Chlorella* has a simple metabolism that allows simple exposure assays to toxic elements, which can be extrapolated to more complex organisms. This fact converts the microalgae in a very suitable bioindicator in toxicity studies, environmental pollution, and antagonist effects and interactions between contaminants and protective substances. The final conclusion is that selenium can protect against mercury toxicity on the basis algae exposure experiments to methylmercury and selenomethionine, with special attention in the effect of selenomethionine chirality on the reduction of organic mercury toxicity.

Objetivos/ Objectives

El objetivo general de esta Tesis es el estudio de los procesos de bioacumulación y biotransformación de elementos esenciales, como el selenio y el yodo, en la microalga *Chlorella*, así como de la respuesta biológica a elementos tóxicos, como el mercurio, en el citado microorganismo.

Asimismo, dada la importancia biológica del selenio, se ha considerado como uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral el estudio de la microalga *Chlorella sorokiniana* como posible alimento funcional enriquecido en este elemento.

Este objetivo general se ha desarrollado en los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar la bioacumulación de yodo y desarrollar de un procedimiento metalómico de caracterización de biomoléculas unidas a este elemento.
2. Aplicar estrategias biotecnológicas para estimular la acumulación de selenio en la microalga *Chlorella sorokiniana*, caracterización de selenoespecies durante el proceso, y establecimiento del perfil de distribución de este elemento entre las macromoléculas y metabolitos de esta microalga.
3. Estudiar los mecanismos biológicos utilizados por la microalga *Chlorella* frente a la exposición a Hg en el medio de cultivo, aplicando procedimientos metalómicos basados en acoplamiento HPLC-ICP-MS y HPLC-QqTOF-MS.
4. Profundizar en el efecto antagonista de la SeMet frente a la toxicidad del metilmercurio, en la microalga *Chlorella*, y estudiar la influencia de la quiralidad.
5. Estudiar la bioaccesibilidad de las especies de Se en la microalga enriquecida en este elemento mediante ensayos *in vitro*. Evaluación de los cambios metalómicos y metabolómicos experimentados por el ratón *Mus musculus* alimentado con el alga enriquecida en selenio.

The general objective of this Thesis is the study of the bioaccumulation and biotransformation processes of essential elements such as selenium and iodine in the microalgae *Chlorella*, as well as the study of the biological response against toxic elements such as mercury in the previously cited microorganism.

Additionally, given the importance of the biological function of selenium, one of the purposes of this Doctoral Thesis has been the study of the microalgae *Chlorella sorokiniana* as functional food enriched with this element.

This general objective has been developed through other particular ones, which are the following:

1. Study of iodine bioaccumulation in the microalgae and development of a metallomic procedure for the characterization of biomolecules bound to this element.
2. Development of biotechnology strategies to stimulate the accumulation of selenium in the microalgae *Chlorella sorokiniana*, characterization of selenoespecies during the process and establishment of the distribution profile of the element among macromolecules and cell metabolites of the microalgae under the study.
3. Study of the biological mechanisms of the microalgae *Chlorella* triggered by the exposition of mercury in the culture medium. For that, metallomic procedures by coupling HPLC-ICP-MS and HPLC-QqTOF-MS will be developed.
4. Deep insight into the SeMet antagonistic mechanism against the toxicity of methylmercury in *Chlorella microalgae*, and study of the influence of its chirality.
5. Study of selenium bioaccessibility in the enriched algae *Chlorella* using an *in vitro* digestion method. Evaluation of Se metabolism in *M. Musculus* mice by feeding animals with selenium enriched microalgae.

Introducción

I. Elementos esenciales y tóxicos

Existen elementos que, estando presentes en los tejidos en cantidades muy pequeñas, al nivel de trazas ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ultratrazas ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), son nutrientes esenciales. De los veintiún elementos reconocidos como esenciales para los organismos vivos, once de ellos son metales (Na, K, Mg, Ca, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn). Estos elementos realizan funciones indispensables para el mantenimiento de la vida, el crecimiento de los seres vivos y su reproducción. Concretamente en los humanos se consideran esenciales el Fe, Zn, Cu, Se, I, Cr, Ni y Co, pues sus deficiencias ocasionan trastornos de funciones biológicas bien establecidas. A estos elementos esenciales, cuya deficiencia en el hombre ha sido ampliamente estudiada, se les denominan también oligoelementos. Se considera que un elemento traza es esencial si: (i) su ingesta insuficiente produce deficiencias funcionales, las cuales pueden revertir cuando el elemento recupera su nivel fisiológico óptimo, (ii) el organismo no puede crecer ni completar su ciclo vital sin este elemento, (iii) el elemento posee una influencia directa sobre el organismo y está involucrado en sus procesos metabólicos, (iv) el efecto concreto de un elemento esencial no puede sustituirse totalmente por ningún otro elemento (*Maret & Copsey, 2012*).

El estudio de Cu, Ni, Zn, Mn y Se tiene interés por su importancia en el metabolismo. Así, el Mn es un cofactor de la enzima piruvato carboxilasa y actúa también como un activador no específico para varias enzimas, como son la superóxido dismutasa (SOD), glicosiltransferasas, arginasa y otras. Otras proteínas en las cuales puede estar presente este elemento son, la albúmina (Alb) y la β 1-globulina (*Calle-Gutiñas et al., 2002*). Además, el Mn es necesario para el metabolismo de las grasas, el correcto funcionamiento del sistema nervioso e inmunológico y los azúcares (*Michalke & Schramel, 2004*). Otro elemento importante es el Cu, que está relacionado con varias proteínas, como la SOD y la citocromo oxidasa, que transporta el Fe, participa en la síntesis del tejido conjuntivo, en el metabolismo de los lípidos y tiene propiedades antioxidantes (*Thunus & Lejeune, 1994*). El Ni, juega un papel importante en el metabolismo del folato (*Encinar et al., 2003*). El Zn está asociado a más de 200 enzimas y proteínas, participando en la mayoría de los procesos metabólicos importantes. Además, este elemento también interviene en la síntesis de proteínas controlada por la expresión genética (*Thunus & Lejeune, 1994*). El Se es un elemento traza esencial para la salud, que forma parte de las selenoproteínas, las cuales poseen importantes propiedades

antioxidantes y previenen el daño celular originado por los radicales libres procedentes del metabolismo que contribuyen al desarrollo de patologías como el cáncer o las enfermedades coronarias (Yan & DeMars, 2014; Rayman, 2012; Josep & Loscalzo, 2013). Por otra parte, las selenoproteínas participan en la regulación de la función tiroidea y representan un papel importante en el sistema inmune (Rayman, 2000). Por último, el I es un elemento traza esencial siendo un constituyente fundamental de las hormonas tiroideas. Estas hormonas participan en el metabolismo de todas las células del organismo y en el desarrollo de los órganos, en particular el cerebro (Porterfield & Hendrich, 1993).

El carácter esencial de un oligoelemento conduce inmediatamente a relacionarlo con el concepto de *requerimiento*. Se ha de establecer una cantidad mínima del citado oligoelemento para el buen funcionamiento del organismo. Sin embargo, todos los elementos pueden originar procesos de intoxicación si la dosis ingerida de sus compuestos es lo suficientemente elevada. Así, podemos decir, que para los elementos esenciales existe un umbral de concentración mínimo que genera una actividad metabólica insuficiente, una concentración mayor asociada con un funcionamiento bioquímico óptimo y, por encima de ésta, concentraciones que tienen carácter tóxico e incluso, letales (Figura 1). Por tanto, existe un rango de concentración, una *ventana biológica*, para cada oligoelemento donde la respuesta fisiológica es óptima y fuera del cual se observan efectos carenciales o tóxicos (Maret & Copsey, 2012).

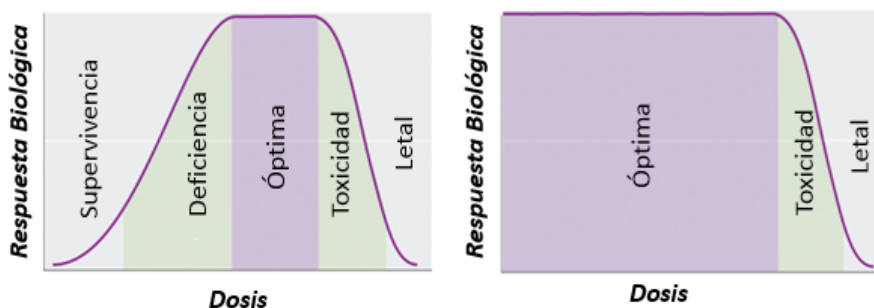


Figura 1. Concentración y respuesta de elementos. Relación entre la concentración y respuesta para elementos esenciales (derecha) y tóxicos (izquierda) (Maret & Copsey, 2012).

Además de los elementos traza esenciales en los organismos vivos, pueden existir otros a nivel traza y ultratrazas, como son As, Cd, Hg, Tl, Pb o Bi, sin una función fisiológica conocida hasta la fecha, que pueden alterar seriamente su metabolismo, originando fenómenos de intoxicación aguda o crónica a muy bajas concentraciones ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Estos elementos se califican como tóxicos. El As es tóxico para la mayoría de las formas de vida, aunque se han encontrado bacterias en un lago de California que sustituyen el habitual fosfato por este elemento tóxico, para vivir y desarrollarse (*Wolfe-Simon et al., 2011*). Asimismo, al incorporarse en la cadena alimentaria, el As inorgánico y sus compuestos son progresivamente metabolizados en organismos marinos, transformados en una forma menos tóxica del elemento mediante un proceso de metilación (*Edmons & Francesconi, 1987*). El Cd es conocido como tóxico ya que produce daños irreversibles en los pulmones y especialmente en el riñón, donde llega en forma de Cd-metalotioneína (*Johri et al., 2010*). El Pb a niveles de traza puede afectar negativamente al cerebro, el sistema nervioso central, las células sanguíneas y los riñones. El Pb forma un gran número de proteínas a nivel celular, pudiendo formar parte de la estructura de la metalotioneína (*Gonick, 2011*). El Hg en todas sus formas químicas puede causar graves problemas de salud, afectando al sistema nervioso e inmunitario entre otros (*Clarkson & Magos, 2006*).

La clasificación de elementos esenciales no es absoluta ya que algunos elementos, históricamente considerados como tóxicos, son ahora considerados como esenciales. Como es el caso del Se, Cr (*Escanero, 1998; Shroeder & Nason, 1971*) y, más recientemente el W (*Lippard & Berg, 1994*), este último considerado como esencial. Además, hay elementos con un doble carácter esencial/tóxico dependiendo de la concentración y/o forma química en la que se encuentren (tales como el, Se y Cr). Finalmente existen elementos que se suministran con fines terapéuticos, como es el caso del Li, Ba, Tc, Pt, Au y Bi, cuya concentración en el organismo debe controlarse igualmente. El ejemplo paradigmático es el cisplatino utilizado en el tratamiento del cáncer (*Lippard & Berg, 1994; Cowan, 1997; Escanero, 1998*).

De todos los elementos citados, como elementos esenciales, el Se y el I son objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, por lo que se profundizará a continuación sobre el papel que desempeñan dichos oligoelementos en el metabolismo humano. Como elemento tóxico se considerará el Hg en relación a su presencia en microalgas, y los mecanismos de defensa que éstas desarrollan cuando crecen en medios contaminados con este metal.

I.1. Selenio: Elemento esencial para los seres vivos

Descubierto por Berzelius en 1817, el Se fue considerado durante mucho tiempo como un elemento carente de toda propiedad biológica e incluido entre las sustancias tóxicas. Es en 1957 cuando Schwarz y Folz establecen su papel esencial en la nutrición animal, mostrando que el Se era capaz de prevenir la necrosis hepática en ratas deficientes en vitamina E (Schwarz & Foltz, 1957). En 1973 Rotruck lo identifica como centro activo de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) de los mamíferos (Rotruck et al., 1973).

En la actualidad, se sabe que el 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 frente a la acción nociva de los radicales libres. Así mismo, este elemento contribuye al aumento de la producción de glóbulos blancos, neutralizando el efecto de los metales pesados y previniendo la aparición de mutaciones. Se conoce que el Se ejerce en los organismos vivos un papel antagónico frente a los numerosos metales tóxicos, como As, Cd, Hg y Pb (Gailer et al., 2000; 2007; Tran et al., 2007; Cabañero et al., 2006; Suzuki & Ogra, 2001; El-Sharaky et al., 2007; García-Barrera et al., 2012).

En la naturaleza el Se puede encontrarse en diferentes formas, tales como selenato, selenito, Se elemental y seleniuro. Como otros micronutrientes, el Se debe obtenerse de la dieta. Sin embargo, la concentración de Se en los alimentos es muy variable pues está directamente relacionada con la concentración de Se en el suelo, o el medio donde se producen estos alimentos. Las principales especies de Se encontradas en los alimentos son: selenato, selenometionina (SeMet), selenocisteína (SeCys) y selenometilselenocisteína (SeMeSeCys) (Whanger, 2002; Dodig & Čepelak, 2004).

En esta última década la investigación de este elemento en diversas matrices biológicas ha crecido de manera exponencial. Hay que destacar que los estudios realizados hasta la fecha, han demostrado de manera inequívoca que las propiedades esenciales o tóxicas del Se, no solamente dependen de su concentración, sino de su forma química.

I.1.1. Metabolismo del selenio en mamíferos

El metabolismo del Se en animales superiores está encaminado principalmente a la síntesis de una serie de enzimas que incorporan residuos de SeCys en sus puntos activos, de tal forma que la presencia del elemento es indispensable para realizar su función catalítica. Estas proteínas son conocidas como selenoproteínas y a ellas se les atribuye el carácter esencial del elemento.

Una vez que se incorpora en el organismo, el Se debe recorrer un largo camino hasta formar parte de las biomoléculas o hasta su excreción. Las rutas metabólicas que siguen las diferentes especies de Se en el organismo no son del todo conocidas, sin embargo, gracias a los estudios realizados en los últimos años, se barajan una serie de hipótesis al respecto. Dependiendo de la especie química y en ocasiones de su concentración, el Se sigue una u otra ruta hasta alcanzar su objetivo final. La figura 2 muestra algunas de las especies de Se más relevantes desde el punto de vista biológico y, por otro lado, en la figura 3 se propone una ruta metabólica para el Se en humanos (Navarro-Alarcón & Cabrera-Vique, 2008; Rayman et al., 2008) mostrando que el seleniuro de hidrógeno es un intermediario común.

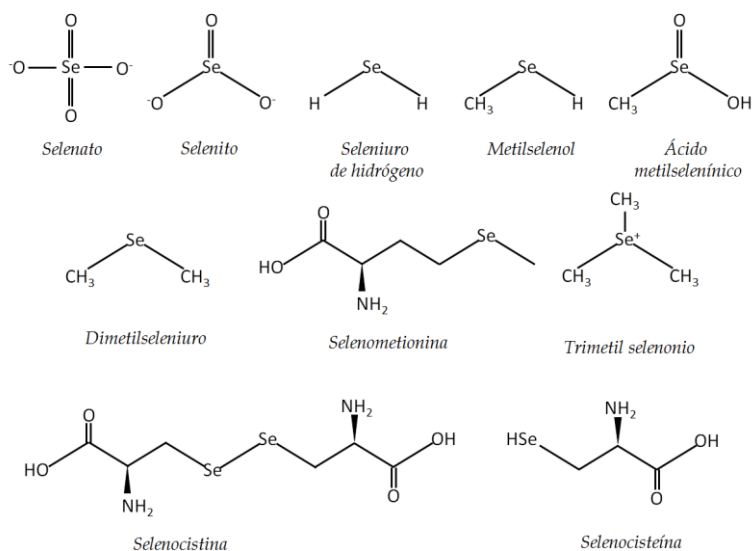


Figura 2. Compuestos de selenio. Principales compuestos de selenio con relevancia biológica.

Una vez ingerido, tanto el Se orgánico como inorgánico, se transforman a seleniuro de hidrógeno o a algún equivalente para la biosíntesis de selenoproteínas, o bien participa en reacciones de metilación secuencial para generar metabolitos metilados, dimetilselenio (DMSe) y trimetilselenonio (TMSe) que son posteriormente excretados (McKenzie *et al.*, 2002). Se habla de seleniuro o equivalente ya que el seleniuro es un compuesto altamente reactivo por lo que podría no encontrarse en su forma libre, sino unido a alguna molécula (Suzuki, 2005). Así, tanto el selenito como el selenato son reducidos por los sistemas glutatión-glutarredoxina y tiorredoxina para la formación de selenofosfato, que contribuye a la formación de SeCys unida al ARNt. Su inserción en la cadena peptídica se produce de manera específica mediante el codón UGA por un complejo proceso aún sin elucidar (Rayman, 2005). Otra vía que puede tomar el H₂Se es la excreción tras varias metilaciones bien a través de la orina o del aliento. La oxidación del seleniuro de hidrógeno puede dar lugar a la producción de superóxidos y otras especies de oxígeno reactivas con efectos tóxicos para la salud (Navarro-Alarcón & Cabrera-Vique, 2008; Rayman *et al.*, 2008). El metilselenol es otro compuesto importante que se encuentra en equilibrio con el seleniuro, y ambos han sido relacionados con las propiedades anticancerígenas que presenta el Se (Rayman *et al.*, 2008).

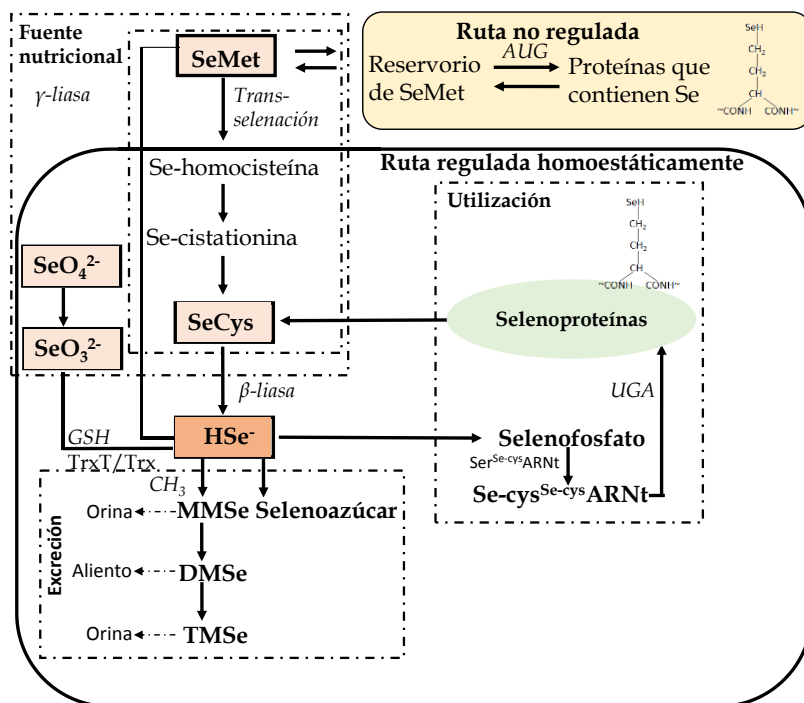


Figura 3. Metabolismo de selenio en humanos. Los metabolitos de Se en la dieta: son incorporados a la célula donde, junto con el pool intracelular, son metabolizados por diferentes rutas que convergen en el seleniuro. El seleniuro sirve como fuente de Se para

la biosíntesis de SeCys. La excreción del exceso de Se en el organismo se lleva a cabo por medio de compuestos metilados de Se y selenoazúcares (Navarro-Alarcón & Cabrera-Vique, 2008; Rayman et al., 2008).

Las distintas formas de Se inorgánico presentan ciertas diferencias en cuanto a su metabolismo. Por un lado el selenito se incorpora a los glóbulos rojos donde es fácilmente reducido a seleniuro de hidrógeno mediante el glutatión (GSH) (Figura 4). Después se une a la Alb, encargada del transporte, que lo traslada al hígado. A diferencia del selenito, el selenato necesita condiciones de reducción más enérgicas para que se forme el seleniuro de hidrógeno, teniendo que pasar primero a selenito. De esta forma, el selenato es incorporado a los hepatocitos mediante el sistema de transporte del fosfato y es parcialmente excretado a la orina. Una vez en el hígado, ambos son utilizados para sintetizar las selenoproteínas que después son liberadas al torrente sanguíneo para distribuirse por los distintos órganos (Suzuki, 2005).

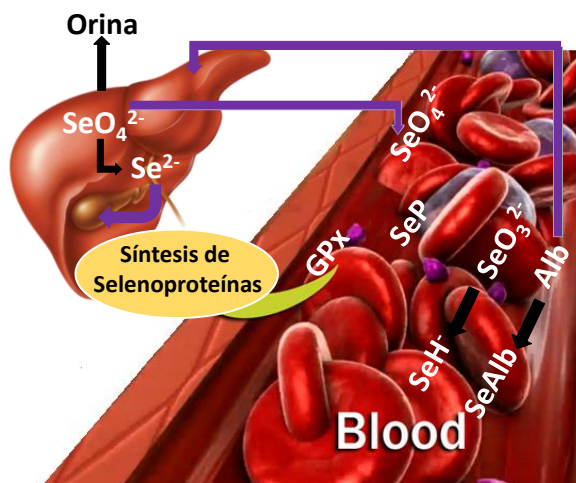


Figura 4. Ruta metabólica de selenio. Ruta metabólica y tráfico de Se en el torrente sanguíneo y el hígado de humanos.

Contrariamente a la relativa sencillez de la ruta metabólica del Se inorgánico, los compuestos orgánicos de Se utilizan rutas mucho más sofisticadas para producir el seleniuro de hidrógeno. La mayoría de los selenoamino ácidos pasan a seleniuro mediante la acción de la enzima liasa. La SeCys del organismo se convierte directamente en seleniuro de hidrógeno bajo la acción de la β -liasa. También mediante esta enzima, SeMeSeCys y el compuesto γ -glutamyl-SeMeSeCys pueden

transformarse en CH_3SeH y a partir de ahí ser convertidas en seleniuro de hidrógeno o ser excretados (*Navarro-Alarcón & Cabrera-Vique, 2008; Rayman et al., 2008*).

La SeMet puede transformarse a SeCys mediante la ruta de la trans-selenización, de la misma manera que la metionina (Met) se convierte en cisteína (Cys) mediante una reacción de trans-sulfuración. Esta ruta conlleva varios pasos en los que se forma Se-homocisteína y Se-cistationina como productos intermedios. Se ha sugerido que la SeMet también podría dar lugar al CH_3SeH a través de la γ -liasa en caso de exceso de SeMet (*Suzuki, 2005*), aunque esta reacción parece ser menos efectiva que la llevada a cabo por la β -liasa en la SeMeSeCys (*Ohta, Y. et al., 2009*). La SeMet es incorporada a las proteínas sustituyendo a la Met de manera inespecífica, a través del mismo codón que ella (AUG), ya que el $^{\text{Met}}\text{ARNt}$ no distingue entre ambas, y forma así las llamadas proteínas que contienen Se (*Suzuki, 2005*). Esta sustitución no altera la estructura de la proteína de manera significativa, sin embargo, la actividad enzimática sí podría verse modificada en cierta medida si se produce cerca del centro activo debido a la diferencia de hidrofobicidad entre los grupos CH_3Se y CH_3S (*Shrauzer, 2000*). Por otro lado, existen rutas no específicas de inserción de Se en proteínas que se basan en la similitud química entre el Se y el S, que permite al Se utilizar las rutas metabólicas del azufre (*Papp et al., 2007; Zhang & Gladyshev, 2009*). La SeCys libre puede ser un sustrato de la cisteil-ARNt sintetasa que, al formar selenocisteil-ARNtCys, incorpora a la SeCys de forma no específica en posiciones donde se encontraba la Cys en las proteínas.

El nivel de incorporación de la SeMet a proteínas depende de la relación SeMet/Met y de la dosis ingerida, ya que ante un consumo bajo de Met, la SeMet se incorpora en mayor medida (*Shiobara et al., 1998*). De esta manera, la SeMet que no es inmediatamente metabolizada puede ser utilizada posteriormente como fuente de Se, puesto que puede almacenarse durante largos periodos de tiempo en el organismo (riñón, hígado, páncreas, estómago, músculo esquelético) en proteínas, que en caso de necesidad, se degradarían liberando SeMet en su forma libre, pasando después a SeCys mediante la ruta de la trans-selenización (*Shrauzer, 2000; Suzuki, 2005*). Sin embargo, en caso de exceso, la SeMet podría quedar retenida de forma irreversible en proteínas de pelo y en glóbulos rojos, de forma que no se pudiese disponer en ella en un futuro (*Shiobara et al., 1998*). Puesto que los animales superiores no son capaces de sintetizar Met tampoco podrían producir SeMet, por lo que en caso de ingesta únicamente en forma de

Se inorgánico, sólo podrían sintetizar selenoproteínas pero no se formarían proteínas que contienen Se (*Shrauzer, 2000*).

Finalmente, la excreción de Se se produce principalmente a través de la orina en forma de selenoazúcares (1 β -selenometil-N acetilgalactosamina) (*Gammelgaard et al., 2012*). Cuando se producen niveles excesivos de Se, éste se ha encontrado en el organismo como TMSe, y en estos casos incluso se han observado otras vías de detoxificación del mismo, como el pelo (en proteínas que contienen Se) o mediante su exhalación en el aliento en forma de DMSe (*Navarro-Alarcón & Cabrera-Vique, 2008; Ohta et al., 2009; Rayman et al., 2008*).

1.1.2. Factor clave en la esencialidad: Selenoproteínas

Se ha comprobado que la mayoría de las funciones biológicas atribuidas al Se están mediadas por las GPx y selenoproteína P (SeP) (*Mostert, 2000*), así como por la selenoalbúmina (SeAlb). Las selenoproteínas se encuentran en microorganismos unicelulares (bacterias y arqueas), y en eucariotas. Sin embargo, algunos organismos, como levaduras y plantas, han perdido el residuo de SeCys durante su evolución y por tanto no tienen selenoproteínas, pero sí homólogos con Cys (*Castellano, 2009*).

El número de selenoproteínas varía de manera significativa entre organismos, desde las 3600 encontradas en organismos marinos (*Zhang & Gladyshev, 2008*) hasta las 15 presentes en bacterias (*Arnér, 2010*). En la actualidad se han identificado 25 selenoproteínas en seres humanos, aunque la función de muchas de ellas no ha sido aún determinada (*Rayman, 2012*). Entre las selenoproteínas más relevantes se encuentran las de las familias GPx, tioredoxina reductasa, la yodotironina desyodinasas, selenoproteína W, SeP, selenofosfato sintetasa, selenoproteína 15, selenoproteína M, metionina sulfóxido reductasa y las selenoproteínas I, N, O, H, T, K y S. La mayoría de las selenoproteínas de humanos están también presentes en roedores, 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 (*Kryukov et al., 2003*).

Las selenoproteínas son 1000 veces más efectivas en biocatálisis que las moléculas homólogas, que contienen el residuo Cys (*Arnér, 2010*). El residuo SeCys es un nucleófilo más poderoso y por tanto más reactivo que la Cys, lo que implica que las selenoproteínas tiene una mayor reactividad frente a sustratos electrofílicos (*Johansson*

tiene una mayor reactividad frente a sustratos electrofílicos (*Johansson et al., 2005*). Su mayor reactividad en catálisis es una de las principales razones por las que el Se está involucrado en numerosos mecanismos metabólicos presentes en la naturaleza (*Castellano, 2009*).

En la figura 5 aparecen esquematizadas las funciones esenciales de las selenoproteínas mejor caracterizadas hasta el momento. Además de las selenoproteínas citadas, es interesante citar la presencia de una selenoproteína en la cápsula mitocondrial de los espermatozoides, lo que confirma la amplia presencia de estas biomoléculas, y su importancia en el metabolismo y funcionamiento de los seres vivos. En la actualidad se encuentra en discusión si se trata de una única selenoproteína o es una variedad de la GPx4. 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 (*Behne, 1997*).

La SeAlb no es una selenoproteína propiamente dicha, sin embargo, debido a su importante papel en el transporte de Se hacia el hígado para llevar a cabo la síntesis de SeP, se ha convertido en una proteína de gran importancia en el metabolismo.

Glutati3n peroxidasa
Enzimas antioxidantes.

GPx1

Proteina m3s abundante en mamíferos. Se encuentra en el citosol de todas las células y su actividad es regulada en el hígado (Tapiero et al., 2003).

Tiorredoxina reductasa
Reducci3n de los nucle3tidos en la sntesis del ADN, control del estado redox.

GPx2

Presenta protecci3n de la toxicidad de hidroper3xidos lipídicos y se expresa principalmente en el tracto gastrointestinal (Chu et al., 1993).

Selenoproteína P
Proteína plasmática encargada del transporte de SeCys a diferentes 3rganos (Rotruck et al., 1973). Antioxidante del sistema vascular y de las membranas celulares (Hawkes & Hornbostel, 1996).

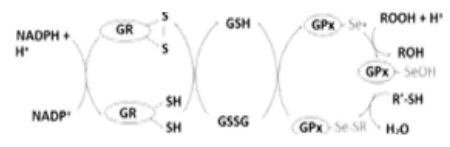
GPx3

La segunda proteina m3s abundante en el plasma sanguineo (Tapiero et al., 2003). Tambi3n se ha encontrado en leche materna (Bhattacharya et al., 1988). Se encuentra en el exterior de la célula (Gladyshev et al., 1998).

GPx4

Reduce específicamente ácidos grasos hidroper3xidos que son esterificados a fosfolípidos (Tapiero et al., 2003). Otra funci3n atribuida a esta enzima es la reducci3n de hidroper3xidos y ésteres del colesterol en membranas y lipoproteínas de baja densidad (Thomas et al., 1990).

Selenofosfato sintetasa
Necesaria para la sntesis de selenofosfato, precursor de la SeCys (Beckett & Arthur, 2005).



Yodotironina desyodinasas
Producci3n y regulaci3n del nivel T3 a partir de T4 (Beckett & Arthur, 2005; Rayman, 2012; Tapiero, 2003).

DIO I

La primera selenoproteina en la que se observ3 la inserci3n de SeCys mediante el triplete UGA (Berry et al., 1991). Ésta se encuentra fundamentalmente en la gl3ndula tiroidea, aunque tambi3n en tejidos de riñ3n e hígado (Patching & Gardiner, 1999; Suzuki et al., 1999).

Selenoproteína W
Necesaria para funci3n muscular (Beckett & Arthur, 2005).

DIO II

Tiene como funci3n principal la producci3n de T3 intracelular (Larsen & Berry, 1995) y se halla en la gl3ndula pituitaria, sistema nervioso central, placenta y tejido adiposo en humanos y ratas, como tambi3n en la gl3ndula tiroidea y m3sculo cardíaco de humanos.

Selenoproteína 15 KDa
Funci3n biol3gica. Se relaciona con la protecci3n anticancerígena de las células secretoras (Rayman, 2005).

DIO III

Se localiza en el cerebro, piel y placenta y es la responsable de la degradaci3n de la forma activa de la hormona tiroidea, dando lugar a otras especies inactivas (Patching & Gardiner, 1999).

Selenoproteína 18 KDa
Funci3n biol3gica. Se relaciona con el sistema endocrino (Kyriakopoulos et al., 2002).

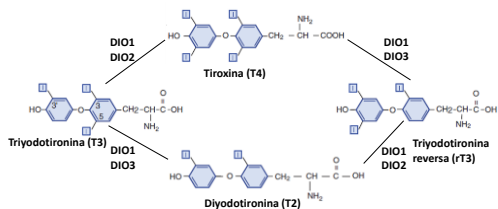


Figura 5. Principales selenoproteínas. Selenoproteínas identificadas en tejidos y fluidos biológicos en humanos y su posible funci3n.

I.1.3. Implicaciones biológicas de las especies químicas del selenio: Efecto protector

Como comentamos anteriormente, los efectos beneficiosos del Se se pusieron de manifiesto al constatar que este elemento protegía a las ratas deficientes en vitamina E. Desde entonces se han identificado otras funciones bioquímicas y fisiológicas de este elemento relacionadas con la presencia de selenoproteínas en los tejidos y los fluidos biológicos de los mamíferos.

La biosíntesis de estas selenoproteínas dependen de la disponibilidad del Se. Como consecuencia de ello, las selenoproteínas con una función biológica poco relevante responden más rápidamente a la deficiencia de Se, perdiendo su actividad, mientras que las selenoproteínas con una función biológica de mayor importancia permanecen estables en estados carenciales de tipo moderado, y sólo disminuyen su actividad cuando la deficiencia es sustancial y prologada (*Köhrle et al., 2000; Müller et al., 2003*). Estas proteínas se recuperan rápidamente tras la ingesta de complementos nutricionales con Se (*Brigelius-Flohé, 1999*). Actualmente hay evidencias que demuestran que déficits parciales de Se pueden tener un papel importante en la susceptibilidad a ciertas enfermedades y, por tanto, en el estado de la salud. Así, concentraciones bajas de Se pueden contribuir a la etiología de diversas enfermedades, aunque también se ha demostrado que en algunos casos este déficit parcial puede ser una consecuencia de la propia enfermedad que al mismo tiempo puede contribuir a exacerbarla (*Rayman, 2000*).

Entre los diversos procesos patológicos relacionados con el Se, está demostrado que su ausencia en el organismo provoca trastornos considerables en las funciones hepática y muscular, con consecuencias nefastas para el corazón. Este efecto se ha atribuido a la capacidad de la GPx de evitar la oxidación de lípidos y reducir la agregación plaquetaria (*Joseph & Loscalzo, 2013*), aunque es difícil establecer si el Se ha jugado un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, o es consecuencia de la misma (*Yoshizawa et al., 2003*). El Se parece, además, tener un papel importante en la fertilidad masculina, siendo requerido para la biosíntesis de testosterona y la formación y normal desarrollo de los espermatozoides (*Ahsan et al., 2014*), como se ha comentado previamente. La suplementación con $100 \mu\text{g Se-día}^{-1}$ de varones subfértiles con estatus de Se deficiente incrementó la movilidad de los espermatozoides y aumentó un 11% su fertilidad (*Scott et al.,*

1998). Sin embargo, otro estudio realizado con hombres sanos mostró una disminución de la movilidad de los espermatozoides (*Hawkes et al., 2001*). Este efecto se relacionó con las funciones biológicas de la GPx4 (*Scout R. & MacPherson A., 1998*). La deficiencia de Se también se ha relacionado con enfermedades infecciosas. El Se es un potente inhibidor de la replicación del VIH *in vitro* (*Rayman, 2012; Beck et al., 2004*), y parece ser un nutriente muy importante en individuos afectados por VIH. Al Se se le atribuye capacidad antiviral, debido a su presencia en la enzima antioxidante, GPx1. La deficiencia de Se puede afectar la función tiroidea, de modo que la hormona tiroidea activa es sintetizada en presencia de la enzima tiorredoxina reductasa, de la que el Se es un constituyente esencial. Se produce una agravación del hipotiroidismo cuando al déficit de yodo se le une un déficit de Se (*Rayman, 2000; Combs, 2001*). Además, se ha asociado la presencia de bajas concentraciones de Se en el plasma sanguíneo de ancianos con la senilidad y la aparición de deterioro cognitivo. En este sentido, se ha encontrado que los niveles de Se en el cerebro de pacientes de Alzheimer era un 40% inferior a la concentración encontrada en individuos sanos (*Berr et al., 2000; Rayman, 2000; 2012*).

Entre los efectos beneficiosos atribuidos al Se puede destacarse su papel en la prevención del cáncer. Diversos estudios epidemiológicos han establecido que existe una relación clara y directa entre un bajo nivel de Se en sangre y el desarrollo de cáncer. El primer estudio sobre la prevención de cáncer debido a una suplementación nutricional con Se fue desarrollado por Clark y colaboradores en el año 1996 (*Clark et al., 1996*).

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 (*McKenzie & Rafferty, 2001*). El efecto quimiopreventivo de este elemento, suministrado en dosis elevada, se ha mostrado efectivo en la disminución de la incidencia de cáncer de hígado, pulmón, colon, estómago y páncreas (*Ip, 1998; Yan & DeMars, 2014*).

Los estudios epidemiológicos proporcionan evidencia de una relación inversa entre la ingesta de Se y la mortalidad por cáncer. En un estudio prospectivo, realizado en una muestra de 34.000 hombres de la Harvard-based *Health Professional's Cohort*, los situados en el quintil inferior en el contenido corporal de Se, presentaban tres veces más posibilidades de desarrollar cáncer de próstata (*Giovannucci, 1998; Yoshizawa et al., 1998*). Entre otros muchos estudios relacionados con

la prevención del cáncer, puede citarse el realizado con una población china, donde el 15% de sus habitantes se hallan infectados por el virus de la hepatitis B, con un riesgo 200 veces mayor de desarrollar carcinoma hepatocelular. Al suministrarle a los enfermos potenciales suplementos alimentarios con levaduras selenizadas, se inhibió el desarrollo del cáncer en los cuatro años posteriores, a diferencia de varios individuos pertenecientes al grupo control, a los que se le suministró tabletas placebo (Yu et al., 1999).

La absorción y distribución del Se en los tejidos, así como la capacidad en la prevención del cáncer, dependen de la dosis y de la forma química en que el elemento es suministrado (Spallholz, 2001). Se ha demostrado que la especie metilselenol y otras especies monometiladas son efectivas en la prevención de esta enfermedad (McKenzie & Rafferty, 2001; Ip & Dong, 2001). Así, en numerosos estudios se ha atribuido a la especie SeMeSeCys, fácilmente metabolizada a metilselenol, un fuerte efecto protector frente a distintos tipos de cáncer. Utilizando este compuesto en experimentos realizados con ratas, se constató una mayor eficiencia en la prevención del cáncer de mama al comparar los resultados obtenidos con el suministro de otros compuestos de Se (Ip & Dong, 2001). Los compuestos aromáticos como trifenilselenonio (Ip & Lisk, 1994), y varios alquil y aril selenocianuros (Ip & Lisk, 1994), compuestos sintéticos de Se, no utilizados en la síntesis de selenoproteínas, también han mostrado efectos anticancerígenos. Zhang y colaboradores, han observado que la expresión de proteínas oncogénicas y supresoras del cáncer de próstata está directamente relacionada con la especie de Se. Mientras que el selenito y 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 (Zhang et al., 2011).

Uno de los ensayos sobre el cáncer que más controversia ha generado es el ensayo sobre la influencia del Se y la Vitamina E (individual y conjuntamente) en el Cáncer de Próstata (Estudio SELECT), ya que no se produjo disminución del cáncer y surgieron algunos casos de diabetes tipo II, además de observarse efectos adversos como alopecia y dermatitis (Ledesma et al., 2011; Rayman, 2012). Se han planteado varias hipótesis para explicar estos resultados. Normalmente la levadura selenizada, la cual presenta un 60-70% de SeMet y el resto de otros compuestos de Se, es utilizada como fuente de Se en este tipo de estudios, mientras que el ensayo SELECT administró SeMet directamente, lo que podría sugerir que los verdaderos

responsables del efecto anticancerígeno de la levadura fueran compuestos de Se distintos a la SeMet, o bien presentar un efecto sinérgico con la SeMet. Además, los participantes del estudio SELECT presentaban niveles de Se altos al comienzo del mismo, lo que habría contribuido a superar la cantidad de Se óptima, hecho que, como se comentó anteriormente, podría ser otro factor que provocara la disminución del efecto anticarcinogénico del Se.

Resumiendo, con la información de la que se dispone en la actualidad, se puede decir que el efecto anticarcinogénico del Se puede explicarse en base a un aumento de la actividad de selenoproteínas con funciones antioxidantes y de regulación redox, pero no existe ninguna teoría establecida acerca del mecanismo de acción. Sin embargo, las especies monometiladas de Se, como son el metilselenol o el seleniuro de hidrógeno, han sido postuladas como las responsables de las propiedades anticarcinogénicas del Se. Por ello, el selenito, SeMet o la SeMeSeCys son los compuestos de Se más utilizados en estudios de prevención o tratamiento contra el cáncer, ya que se degradan fácilmente en dichas especies en el organismo (*Tapiero et al., 2003*).

I.1.4. Selenio en alimentos y bioaccesibilidad

La principal fuente del Se para animales y el hombre, excepto en casos de exposición laboral, es la dieta (*Litov et al., 1991*). La Cantidad Diaria Recomendada (*Recommended Dietary Allowance, RDA*) de este elemento no posee un valor fijo y difiere en función del país. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (*USDA, 2000*) establece una RDA de $55 \mu\text{g Se día}^{-1}$ de Se tanto para hombres como para mujeres, mientras que la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (*AESAN, 2011*) distingue entre sexos y recomienda 55 y $70 \mu\text{g Se-día}^{-1}$ para hombres y mujeres, respectivamente. La dosis de Se recomendada depende de factores tales como la edad, sexo o región (*Rayman, 2004; García-Barrera et al., 2015*).

El Se entra a formar parte de la cadena alimentaria a través de las plantas, aunque su incorporación depende no sólo del contenido de Se en el suelo y su geoquímica, sino de las condiciones de pH, la lluvia o la actividad bacteriana (*Rayman, 2002*), que pueden modificar la solubilidad de las especies de Se y su contenido en el suelo. Como consecuencia de ello, la concentración de Se en la dieta se encuentra ligada a su concentración en el suelo, por lo que el estatus de Se de la población también lo estará. Dumont y colaboradores recopilaron

valores del contenido de Se en suelo, alimentos ingeridos, plasma, orina y leche materna de individuos de diferentes países demostrando esta relación (*Dumont et al., 2006*).

Las fuentes principales de Se en la dieta son la carne, pescados y mariscos, en los que el Se se encuentra unido a proteínas. Los riñones seguidos por el hígado, son los tejidos animales con mayor contenido en este elemento. En general, todos los alimentos utilizados en la dieta, la ternera, el cerdo, el pollo y el pescado suponen, aproximadamente, el 36% del Se total ingerido; mientras que el pan y los cereales el 22% (*Holben & Smith, 1999*). Los individuos vegetarianos y los lacto-vegetarianos tienen un mayor riesgo de padecer deficiencia en Se. Las concentraciones aproximadas del Se en los principales grupos de alimentos destinados al consumo humano se recogen en la siguiente tabla (Tabla 1).

Los granos de soja y otros granos contienen un elevado contenido de SeMet frente al de selenato o SeCys. Las nueces de Brasil, el hígado y el cangrejo son los alimentos con mayor concentración de Se, sin embargo, su ingesta diaria es demasiado pequeña para poder considerarse un aporte importante de Se (*Rayman, 2002*).

Como puede apreciarse en la tabla, hay un gran conocimiento del contenido total de Se en plantas, y las especies concretas en las que se encuentran. Sin embargo, hay mucha menos información sobre las formas químicas de este elemento de origen animal y su disponibilidad. Un ejemplo claro de la dificultad de estudiar el Se en estos alimentos es el pescado, ya que su concentración varía mucho en función de la forma que se ingiera fresca, cocinado o en conserva.

Es importante tener en cuenta que no sólo es necesario ingerir una correcta cantidad de Se, sino en una forma química adecuada, puesto que ello depende la eficacia de su incorporación al organismo. Esto ha llevado a definir algunos términos como biodisponibilidad o bioaccesibilidad.

Alimento	Especie determinada	Contenido en Se ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
		0,1-30 (Occidente de EE.UU.)
Cereales	Se	0,016-0,021 (Dinamarca)
		0,007-0,011 (Finlandia, Suecia y Noruega).
Maíz, arroz y cebada	Se	≤ 30 (EE.UU.)
Trigo	Se ⁺⁶	≤ 100
Maíz	SeMet	0,01-19,01 (China)
Cebada	Se	0,3-20,2 (Dinamarca)
Nuez de Brasil	Se total	35,1 (Brasil)
Nueces	Se total	0,38 nuez negra y 0,20 nuez blanca
Anacardos	Se total	0,27
Nueces de Pecan	Se total	0,10
Vegetales (zanahorias, patatas, tomates,...)	Se ⁺⁶	≤ 6 (Se total)
Espárragos	Se ⁺⁶	11 (Reino Unido)
Col	Se ⁺⁶	94
Setas	Se	0,77 (<i>Agaricus bisporus</i>)
		0,043 (<i>Lentinula edodes</i>)
Cebolla	Se ⁺⁶	17
Ajo	Se ⁺⁶	<0,5 (natural)
		68 (enriquecido)
Carne	Se	0,3 (EE.UU.)
Carne de vacuno, cerdo y cordero	Se	0,03-0,15 (Reino Unido)
Pavo	Se	0,1-0,2 (Reino Unido)
Pescado	Se	0,42
Pescado blanco	Se	0,4-4,3 (EE.UU.)
Pescado azul	Se	2,5-4,2 (EE.UU.)
Pulpo	Se	0,13 (España y Portugal)
Sardina, pez espada y atún	SeMet	0,43, 0,47 y 0,92 (España y Portugal)
Moluscos, crustáceos y vainas	Se ⁺⁶	0,15-4,15 (Enlatados)
Bacalao	Se ⁺⁴	1,5

Tabla 1. Concentración de selenio en alimentos. Concentraciones de Se total encontradas en alimentos y sus especies químicas.

El término biodisponibilidad ha sido definido por varios autores, pero a veces se interpreta de manera diferente. Ruby y colaboradores, definen este término como “la fracción de un elemento ingerido que se absorbe a través de la barrera intestinal y pasa al torrente sanguíneo u órgano” (Ruby *et al.*, 1999). Pero otros autores consideran esta fracción como la cantidad de este elemento que se utiliza con eficacia por el organismo y es transformado en una forma bioquímicamente activa. Mientras que Schümann y colaboradores, definen biodisponibilidad como “la fracción de un elemento que se absorbe y que alcanza la

circulación sistémica con el fin de ser distribuido a los órganos y tejidos, donde eventualmente puede llegar a ser bioactivo” (Schümann *et al.*, 1997). Esta fracción de Se se ha calculado utilizando principalmente la actividad de la GPx (Pedrero & Madrid, 2009), y también mediante su concentración en diferentes órganos (Pedrero & Madrid, 2009). Por otra parte, la fracción bioaccesible es la fracción que es soluble en el intestino y es por lo tanto disponible para los procesos posteriores de absorción a través de la mucosa intestinal (Thiry *et al.*, 2012).

En resumen, la fracción biodisponible de Se puede ser considerada como la cantidad de Se que se absorbe a través de la barrera intestinal alcanzando la circulación sistémica, la fracción bioaccesible de Se cómo la fracción que es soluble en el intestino y la fracción bioactiva de Se cómo la cantidad de Se que es transformado en selenometabolitos activos (Thiry *et al.* 2012).

La biodisponibilidad de las formas orgánicas e inorgánicas del Se es del 50-100% (Basu & Donaldson, 2003; Thomson, 2004). En general, las formas orgánicas de Se presentan mayor biodisponibilidad. SeMet es absorbida y retenida más eficientemente que las formas inorgánicas (Rayman, 2000). En cuanto a los alimentos, en la mayoría de los vegetales el Se es altamente biodisponible (85-100%), mientras que en el pescado, a pesar de su alto contenido en este elemento, la biodisponibilidad es menor (20-50%) (Pedrero & Madrid, 2009). La biodisponibilidad de Se en productos cárnicos es aproximadamente 15% (Finley, 2006). Finalmente, otros alimentos consumidos diariamente presentan una biodisponibilidad más baja, variando desde <2% en leche de cabra hasta 7% en leche de oveja y vaca (Shen *et al.*, 1997).

Para evaluar la fracción bioaccesible, o máxima concentración de un elemento disponible para su absorción, puede aplicarse una digestión gastrointestinal *in vitro* (Cabañero *et al.*, 2004). Este tipo de estudios son una alternativa a los estudios realizados en humanos, presentando como ventajas su rapidez, sencillez y bajo coste económico. A pesar de ello, los resultados más fiables son los obtenidos *in vivo*. También existen otras metodologías complementarias para determinar la fracción biodisponible, que se están utilizando en los últimos años como sustitutorias de los estudios en humanos. Este es el caso del empleo de cultivos celulares para estudios de absorción. La línea celular Caco-2, procedente del carcinoma de colon humano, muestra características comparables con las de células del epitelio intestinal humano, lo que permite una buena correlación con la

absorción, por ejemplo, de metales provenientes de alimentos, como ya estudiaron Glahn y colaboradores para el Fe en los años 90 (Glahn *et al.*, 1996). Desde estos años se han desarrollado diversos estudios utilizando este modelo celular, tanto para metales, como Fe, Zn, Ca, etc. (Lodemann *et al.*, 2013; Salunke *et al.*, 2012), como para compuestos de otra naturaleza, drogas, etc. (Artursson *et al.*, 2012). Posiblemente el mayor inconveniente de esta metodología sea que conlleva un mayor coste frente a la digestión gastrointestinal *in vitro*.

I.1.5. Toxicidad por excesiva ingesta de selenio: Selenosis

A pesar de que el Se es un oligoelemento esencial, su ingesta en exceso puede resultar tóxica. Como es sabido, la concentración más alta de una ingesta tolerable de un elemento o nutriente es la que administrada diariamente no pone en riesgo de efectos adversos a la mayoría de los individuos. En España la dosis máxima tolerable de Se es de $400 \mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$ para adultos, estando la toxicidad producida por este elemento mucho menos generalizada que la deficiencia (Cocho, 2000).

Las primeras evidencias de la toxicidad inducida por Se (Selenosis) fue observada por Marco Polo al descubrir plantas seleníferas en una región montañosa de China cuya ingesta causaba en los animales la pérdida de las pezuñas.

La toxicidad del Se depende de factores como la forma química, la especie biológica, la concentración y las posibles transformaciones que puede sufrir en su interacción con el medio. Muchas especies orgánicas de Se, como es el caso de los selenoaminoácidos, son esenciales y forman parte de las proteínas, por lo que su toxicidad potencial se reduce. Las especies metiladas de Se, salvo el TMS₂Se, son volátiles y tóxicas a niveles de concentración elevados. Las especies monometiladas son generalmente bien toleradas, debido a que pueden transformarse fácilmente en otras con menor actividad biológica y de fácil excreción por el organismo (Levander, 2001). En cuanto a las formas inorgánicas, el Se elemental parece ser el menos tóxico por ser el más insoluble y por tanto más difícilmente asimilable por los organismos. El selenito es más tóxico que el selenato, pero a ambos se les atribuyen propiedades mutagénicas (Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids, 2000).

Los casos de toxicidad en humanos son escasos (Combs, 2001) y se desconocen los niveles precisos en la dieta para producir intoxicación crónica, pero cantidades en el orden de $2\text{-}8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ son

capaces de producir graves lesiones. La selenosis, se caracteriza por la fragilidad y pérdida de pelo y uñas. Otros síntomas son la afectación gastrointestinal, lesiones cutáneas, caída de los dientes y afectación del sistema nervioso. La toxicidad aguda por Se tiene como signos característicos las náuseas y vómitos, diarrea, aliento a ajo, pérdida de pelo, cambios ungueales, acidosis metabólica, irritabilidad, fatiga y neuropatía periférica (*Reid et al., 2004*).

I.2. Yodo: Elemento esencial para los seres vivos

Los primeros escritos sobre el yodo datan del año 3600 a.C. en China, donde se demostró que el bocio disminuía al ingerir algas y esponjas de mar quemadas (*Leung et al., 2012*). El yodo fue descubierto en 1811 por Courtois mientras estaba aislando compuestos de Na y de K de las cenizas de algas marinas. Gay Lussac lo identificó como un nuevo elemento.

En 1985, el yodo fue descubierto en la glándula tiroidea por Baumann y años más tarde Marine y Kimball demostraron que el agrandamiento de la glándula tiroidea, bocio, era causada por el déficit de este elemento y era prevenible mediante la suplementación con yodo (*Marine & Kimball, 1917*). Hoy en día, este elemento es considerado como un elemento químico esencial para la mayoría de los organismos vivos ya que es fundamental para la formación de hormonas tiroideas, imprescindibles en el desarrollo somático y cognitivo del individuo (*Pérez-López, 2007*).

El déficit de yodo produce un amplio espectro de trastornos que incluye el bocio endémico, el hipotiroidismo, el cretinismo, la disminución de la tasa de fertilidad, abortos, aumento de la mortalidad infantil y retraso mental (*Zimmermann & Delange, 2004*). Se calcula que en el mundo hay mil millones de personas con riesgo de sufrir alguna de esas formas de déficit de yodo. Estos efectos son ahora designados como *iodine deficiency disorders* (IDD). El 13% de la población mundial tiene bocio y alrededor de un 10% sufre cretinismo endémico. Contrariamente a lo que se pudiera pensar, el déficit de yodo también afecta a los países desarrollados (*Pérez-Roncero et al., 2013*).

La ingesta diaria de yodo en la dieta es fundamental ya que el cuerpo humano no puede sintetizar este elemento y apenas se almacena en nuestro organismo. Además, en la mayoría de los alimentos cotidianos y en los líquidos más consumidos la cantidad de

yodo es baja (*Haldimann et al., 2005*). Las fuentes naturales de yodo son el pescado de origen marino, la leche, algas, verduras, sal yodada, agua potable y agua marina.

1.2.1. Absorción y metabolismo del yodo

El yodo se ingiere en diferentes formas químicas, absorbiéndose de manera casi completa y rápida en el estómago y en el duodeno, pero esta absorción puede verse disminuida por la presencia de alimentos denominados bociógenos o por el déficit de otros micronutrientes (*Ristic-Medic et al., 2009*). El yodo molecular es absorbido a través de los pulmones y del tracto gastrointestinal. Los compuestos inorgánicos de yodo son también absorbidos cuando se inhala. Los compuestos de yodo en la forma de sales solubles en agua son 100% absorbidos por el tracto intestinal. Yodo y yodato son reducidos a yoduro y absorbidos por el intestino delgado (*Reed et al., 2003*). La absorción gastrointestinal del yodo es similar en niños, adolescentes y adultos, y menor en recién nacidos (*Morreale de Escobar & Escobar del Rey, 2000*).

En mamíferos, y en general en vertebrados, el yodo inorgánico se absorbe por el intestino delgado y pasa a la circulación general para ser captado por el tiroides, donde se oxida y se une a los residuos de tirosina de la tiroglobulina (Tg), originando restos de monoyodotirosina (MIT), T2, T4 y T3 (Figura 6). Esta proteína se comporta como almacén de precursores de hormonas tiroideas, los cuales son liberados mediante hidrólisis de los enlaces peptídicos de la Tg y pasan a la circulación sanguínea, donde son transportados por proteínas plasmáticas (globulina fijadora de T4, transtiretina y Alb) hasta los tejidos donde actúan. Antes de ejercer sus efectos metabólicos las hormonas se liberan de su unión a las proteínas transportadoras. El yoduro se acumula en el tiroides por transporte activo desde el plasma al interior de las células foliculares, venciendo un gradiente electroquímico, mediante la proteína cotransportadora sodio/yoduro (sodium/iodide symporter (NIS)) (*Dai et al. 1996*). En este momento se produce la transformación del elemento en una forma orgánica, es decir, el yoduro concentrado por las células tiroideas se oxida rápidamente por la acción de una peroxidasa tiroidea (TPO), yodando los residuos de tirosilo de la Tg que posteriormente servirán de sustrato para la generación de las yodotironinas (MIT, DIT, T4 y T3) (*Eales, 1997; Taurog, 1999*). El H₂O₂ que necesita la TPO para su acción, se obtiene vía hormona estimulante del tiroides (TSH) mediada por la NADPH oxidasa (*Dumont et al., 1992*) y a través de la dismutación del radical superóxido por la enzima SOD. La TSH ejerce sus dos principales

efectos sobre la glándula tiroides: estimula la producción de THs y promueve el crecimiento celular del tiroides (Roger et al. 1997). Las acciones del H_2O_2 y otras especies de oxígeno reactivo sobre el tiroides son minimizadas a través de la acción del Se contenido en enzimas antioxidantes de la familia de las GPx (Birringer et al. 2002). El daño oxidativo es más severo bajo deficiencias de yodo, ya que la glándula está muy estimulada por la TSH lo que da un exceso de H_2O_2 dentro de la célula con relativo poco yoduro disponible para ser oxidado, produciendo un aumento de estrés oxidativo (Corvilain et al. 1991).

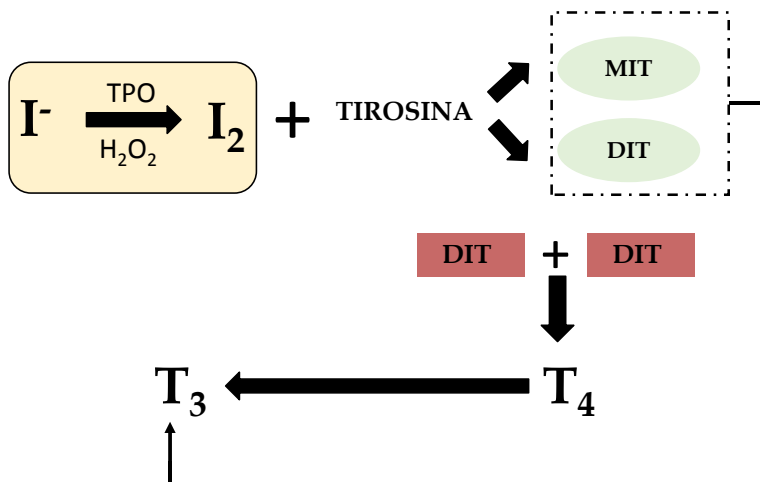


Figura 6. Formación de hormonas tiroideas. Yodación de tirosina y formación de hormonas tiroideas. TPO= Peroxidasa tiroidea (Smyth, 2003).

Para desencadenar su acción en vertebrados, las THs (concretamente la T3) se difunde a través de la membrana celular y se une a receptores nucleares localizados en el núcleo celular (Flatt et al. 2006). Por la interacción de los complejos receptor-hormona con genes específicos, las células son inducidas a sintetizar determinados sistemas enzimáticos (Yen, 2001). El resultado principal de estos procesos es la estimulación de la velocidad metabólica basal. Sin embargo, dentro o fuera de la célula, las THs también pueden actuar como moléculas mensajero mediante receptores de membrana (Hulbert, 2000) y disparar una vía intracelular para incrementar o disminuir la actividad de una proteína preexistente. Aquellas hormonas que exhiben esta actividad biológica son la T4 y la T3. Aunque también se ha demostrado una regulación fisiológica por parte de la T2 (Goglia et al. 2002).

El cuerpo de un adulto contiene entre 10-15 mg de yodo, del cual el 79-90% está en la glándula tiroidea. En el suero, los valores

normales son de 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, del cual el 95% está en forma orgánica y sólo el 5% en forma inorgánica. Las hormonas tiroideas son lipofílicas y pueden atravesar la barrera placentaria, por lo que el feto es sensible a dosis de yodo de la madre durante el embarazo (*Pérez-Romero et al., 2013*).

La vida media del yodo en sangre es de 10 horas, siendo eliminado en un 90% por vía renal, en muy escasa cantidad, a través de las heces, y en menor proporción a través de leche materna, saliva, lágrimas y respiración (*WHO, 1997; Zimmermann & Crill, 2010*).

1.2.2. Problemas relacionados con la deficiencia de yodo

Los trastornos ocasionados por la deficiencia de yodo representan un importante problema de salud pública. La deficiencia de yodo es la causa de retraso intelectual más prevalente en el mundo en la actualidad. Cuando una población no llega a alcanzar los requerimientos fisiológicos de yodo, se producen una serie de alteraciones funcionales y del desarrollo, y hacen su aparición el bocio y cretinismo endémicos, pero también alteraciones menos conocidas, como el descenso de la fertilidad y el aumento de la mortalidad perinatal e infantil. Prácticamente todos los tejidos del organismo necesitan hormona tiroidea para un correcto funcionamiento pero, de un modo especial el organismo en formación y, sobre todo, el cerebro. La carencia de yodo da lugar a una serie de trastornos que dependen de su intensidad y de la edad en la que incide. Aunque los trastornos que derivan de la deficiencia de yodo son fáciles de prevenir mediante una adecuada ingesta de yodo.

La cantidad de yodo necesaria y suficiente para toda una vida es de tan solo de 4 gramos, pero es imprescindible ingerirlo diariamente porque no se puede almacenar en el organismo. Los marcadores para la valoración del estatus nutricional de yodo en seres humanos son la concentración urinaria de yodo, volumen tiroideo y concentración en sangre de Tg. Debido a que más del 90% del yodo ingerido se elimina por la orina, la concentración urinaria de yodo es un buen indicador de la ingesta reciente de yodo y el mejor indicador para detectar los IDD.

La Comisión Europea de Alimentación admite como ingesta tolerable de yodo hasta 600 $\mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$ para los adultos. En la tabla 2 se establecen los márgenes superiores en los que la mayoría de la población no presentaría efectos adversos, aún con elevadas cantidades del micronutriente. El consumo de yodo varía según la zona geográfica.

Además, según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) la dosis de yodo necesaria de manera diaria varía según las distintas etapas de la vida (Tabla 2).

Grupo	Edad	Límite inferior ($\mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$)	Límite superior ($\mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$)
Prematuro		30	
	0-5 meses	90	
	6-12 meses	90	
Niños	1-3 años	90	200
	4-6 años	90	250
	7-10 años	120	300
	11-14 años	150	450
Adultos		150	600
Mujeres embarazadas	30 años	200-300	600
Mujeres lactantes	65 años	200-300	

Tabla 2. Límites de ingesta de yodo. Límites superior e inferior de ingesta de yodo diario según diferentes edades (*Comité Científico Europeo de Alimentos, 2002*).

I.2.3. El yodo en los alimentos

La fuente principal del yodo para el hombre es la dieta. El yodo se encuentra en alimentos en cantidad variable, que podemos consumir de forma cotidiana. Como hemos descrito anteriormente, los alimentos de origen marino son los que contienen mayor cantidad de yodo, como el pescado ($1220\text{-}2500 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), el marisco ($798\text{-}1600 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), siendo las algas y la sal yodada las fuentes más importantes de este elemento. En países industrializados, los productos con mayor cantidad de yodo son la leche ($27\text{-}47 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), los huevos ($93 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), algunos cereales ($47 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) y en menor medida la carne ($50 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), las frutas ($18 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), y los vegetales ($29 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). La cantidad de yodo en los vegetales dependerá de la cantidad de este nutriente en las aguas subterráneas y en los terrenos de cultivo, la estación del año y el uso de fertilizantes (ya que algunos contienen yodo), por lo que las variaciones que se producen son importantes. En los alimentos de origen animal, también es variable su contenido, influenciado por el uso de pastos, piensos y por el uso de compuestos ricos en yodo utilizados como fertilizantes o antisépticos.

Entre las fuentes artificiales de yodo se pueden citar la amiodarona y los jarabes antitusígenos (que contienen yoduro potásico como mucolítico), la eritrosina (aditivo alimenticio E127), la povidona

yodada y los suplementos vitamínicos, especialmente aquellos preparados con extractos de algas (*Roti & Uberti, 2001*).

El yodo contenido en los alimentos y en el agua se encuentra predominantemente en forma de yoduro y el resto unido orgánicamente a aminoácidos. El yodo unido orgánicamente representa una pequeña cantidad del contenido de este elemento en los alimentos. El yodo orgánico se absorbe peor y se excreta, en parte, con las heces (un 20% total de yodo ingerido). En la cocción casera los alimentos pueden perder más o menos yodo según el proceso utilizado: al freír se pierde un 20%, al asar un 23%, y al hervir un 58% (*Koutras et al., 1980*).

Como consecuencia de lo comentado, desde 1950 se inicia la búsqueda de alimentos funcionales enriquecidos en este elemento, que permitan proporcionar una cantidad adecuada de yodo en la dieta. Una de las primeras iniciativas en este sentido fue la adición de yodo en la sal de mesa, NaCl.

I.3. Mercurio: Elemento tóxico para los seres vivos

El mercurio, se encuentra presente en todos los compartimentos del medio ambiente (atmósfera, geosfera, hidrosfera y biosfera) y dado como ocurre con otros elementos no se degrada a diferencia de los contaminantes de tipo orgánico, la cantidad de Hg total ha permanecido constante desde la formación del planeta aunque, como es natural, la distribución de este elemento no es uniforme ni homogénea.

El significado biológico del Hg está fundamentalmente relacionado con su toxicidad, ya que no se han encontrado evidencias de que sea un elemento esencial para el hombre, flora o fauna. Los efectos negativos que pueden tener las diferentes formas de Hg están muy relacionados con la bioacumulación y biomagnificación.

El conocimiento de los diferentes procesos químicos, físicos, hidrológicos, minerales y biológicos que controlan el transporte y acumulación del Hg constituye un paso clave para evaluar adecuadamente la toxicidad y peligrosidad de la presencia del Hg y sus derivados en nuestras vidas (*WHO, 1990*). En los últimos años se ha avanzado mucho en este sentido, pero aún queda muchos estudios por realizar para tener un conocimiento exhaustivo del comportamiento del Hg y sus derivados en el medio ambiente.

I.3.1. Importancia toxicológica del mercurio y sus derivados

La toxicidad del Hg depende de la forma química a la que están expuestas las personas y, por tanto, los síntomas y signos varían según se trate de exposición a Hg elemental, a los compuestos inorgánicos o compuestos orgánicos de este elemento. Pueden citarse dos episodios clásicos relacionados con la contaminación por Hg, como el ocurrido al sur de Japón (Mimata, 1940-1960) y en Irak (1971-1972), lo que han impulsado números estudios relacionados con el metabolismo y los efectos tóxicos del Hg en animales y seres humanos. La dieta, especialmente el consumo de pescado, es generalmente la principal fuente de Hg tanto inorgánico como orgánico.

Entre los compuestos organomercurícos, la toxicidad del metilmercurio (MeHg) es la más conocida y estudiada, ya que es la forma orgánica más común ya que sufre procesos de bioacumulación a través de la cadena alimenticia, y como consecuencia a ello se produce la biomagnificación de los niveles de este elemento desde las concentraciones en que se encuentra en las aguas del orden de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ a los peces depredadores, cuyo consumo representa un serio problema. Los compuestos de alquilvercurio son similares en cuanto a toxicidad, en particular, el etilvercurio (EtHg) y el MeHg. En cambio, otros compuestos orgánicos de Hg, como el fenilvercurio, presentan una toxicidad que se asemeja más al Hg inorgánico. El MeHg presenta una alta afinidad por los grupos tioles de grandes moléculas, tales como proteínas, y de pequeñas moléculas, como la Cys y la glutamina (Gln), formando complejos de alta movilidad a través de tejidos y células, que pueden llegar fácilmente al cerebro. El MeHg se absorbe eficazmente a través de la pared intestinal, pasando a la sangre y de ahí al resto de órganos y tejidos. Una vez en los diferentes órganos se acumula y se va transformando en Hg inorgánico por la acción de radicales libres que rompen el enlace mercurio-carbono. La exposición a Hg durante el embarazo es altamente problemática por la capacidad del MeHg de atravesar rápidamente la barrera placentaria. La característica más destacable de la toxicidad del MeHg, en animales en general y en mamíferos en particular, es el daño selectivo que causa al sistema nervioso central y en menor medida al sistema nervioso periférico. Las principales patologías que se originan son déficits sensoriales y motores, cambios en el comportamiento, ataxia muscular, pérdida de campos visuales y, en menor medida, espasmos que aparecen al continuar la intoxicación (Eto, 1997).

La volatilidad del Hg elemental, así como su continua emisión por la industria de Hg hacen de este elemento un tóxico potencial (Kark, 1994). Cerca del 80% de los vapores inhalados son absorbidos por los tejidos pulmonares. El Hg vapor, al tratarse de un gas monoatómico sin carga, tiene una alta difusibilidad y es soluble en los lípidos, atravesando con gran facilidad las paredes celulares y posteriormente oxidándose en los tejidos corporales a la forma divalente inorgánica por medio de peróxido de hidrógeno y catalasa. Este vapor también penetra con facilidad la barrera hematoencefálica del cerebro y la placenta, y su neurotoxicidad está bien documentada. Sin embargo, la absorción intestinal de Hg elemental es baja. En la actualidad, se sabe que el Hg vapor puede penetrar por las paredes celulares convirtiéndose en Hg^{2+} que a su vez puede actuar en multitud de enzimas. No obstante, no se conoce de manera específica su mecanismo de acción. Se han observado trastornos neurológicos y de comportamiento en seres humanos por inhalación de vapor de Hg elemental que origina los siguientes síntomas: temblores, labilidad emocional, insomnio, pérdida de la memoria, cambios en el sistema neuromuscular y fuertes dolores de cabeza. Se ha observado asimismo efectos en el riñón y el tiroides (Langford & Ferner, 1999).

El catión Hg^{2+} es el que se considera más tóxico entre los compuestos inorgánicos. La vía principal de exposición a estos compuestos es a través de los alimentos y el agua que lo contienen, o por encontrarse en partículas de polvo o aerosol. La toxicidad viene determinada por la afinidad del elemento por los grupos $-\text{SH}$ de los restos de Cys, que constituye el centro catalítico activo de determinadas enzimas cuya actividad se inhibe, y por su solubilidad, ya que las especies menos solubles, como HgS o HgSe , prácticamente no presentan toxicidad, siendo las sales de cloruro de Hg las más tóxicas. Una vez incorporado el catión Hg^{2+} a los organismos vivos tiende a acumularse en los riñones, y en menor cantidad en el cerebro y la placenta. Entre otras enfermedades relacionadas con la exposición crónica a estos compuestos podemos destacar deficiencias renales, trastornos psíquicos, fatiga o pérdida de memoria. En cuanto a su efecto carcinogénico, la evaluación general del IARC (WHO, 1993) concluye que el Hg metálico y los compuestos inorgánicos de Hg no son clasificables en cuanto a carcinogenicidad para los seres humanos.

Las investigaciones de la última década muestran que los efectos tóxicos del Hg pueden generarse a concentraciones cada vez más bajas, y podrían afectar a la población mundial en mayor extensión de lo que

se había pensado. Por ello, el grado de toxicidad de estas sustancias, sobre todo la del MeHg, está actualmente en discusión.

I.3.2. Exposición a mercurio a través de la dieta: Bioacumulación

Aunque las condiciones locales pueden influir en la exposición al Hg de ciertas poblaciones, de forma general la exposición de la población al Hg se produce a través de los alimentos. Un factor muy importante de los efectos del Hg en el medio ambiente es su capacidad para acumularse en organismos y ascender por la cadena trófica. Hasta cierto punto, todas las especies de Hg pueden llegar a acumularse, pero el MeHg se absorbe y se acumula más que otras especies.

En una primera etapa, el MeHg es absorbido por el zooplancton y los pequeños microorganismos presentes en los medios acuosos para después pasar a pescados y moluscos (Figura 7). En este proceso, se pasa de concentraciones en el agua de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ a concentraciones en los peces de $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Algunos estudios indican que el Hg inorgánico se une a las paredes de las membranas de las diatomeas marinas mientras que el MeHg se acumula en la parte soluble de las diatomeas (*Mason et al., 1996*). Los organismos que se alimentan de estas diatomeas no asimilan las paredes celulares, excretándose el Hg inorgánico y quedándose con el MeHg. La biomagnificación que sufre en etapas superiores de la cadena alimentaria, se explica considerando la alta especificidad de la absorción del MeHg en el intestino y por la formación de enlaces covalentes con grupos sulfhidrilo proteico. Generando un enriquecimiento del MeHg cuando se pasa de un nivel trófico al siguiente nivel superior.

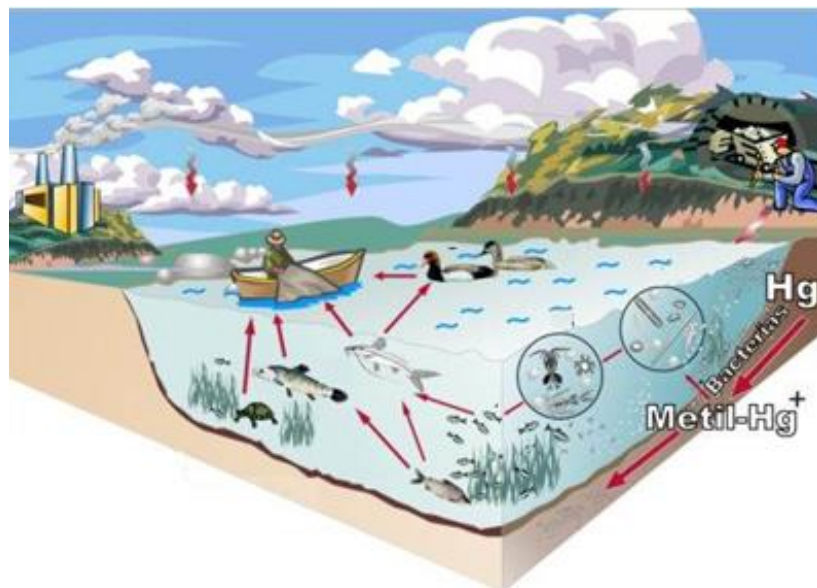


Figura 7. Biomagnificación de las concentraciones de mercurio en el medio acuático. Las emisiones de mercurio son transportadas principalmente como mercurio elemental Hg^0 , oxidadas en la atmósfera Hg^{2+} , y depositadas por las lluvias y contacto con la superficie. Las bacterias anaeróbicas convierten una pequeña parte en $MeHg$, que luego es concentrado en la cadena alimentaria acuática (*Northeast Waste Management Official's Association, 2000*).

El consumo de pescado constituye para el hombre una excelente fuente de proteínas y de oligoelementos como Se y I. Además algunas especies de pescados grasos aportan cantidades significativas de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 que resultan beneficiosos en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, en la actualidad, se considera que el consumo de pescado constituye la principal fuente de exposición de mercurio (*EFSA, 2004*).

Además del pescado, se ha de tener en cuenta que se emplean productos derivados de la pesca en la alimentación animal debido a su alto contenido en minerales, como las harinas de pescado en la crianza de aves. Por ello, la presencia de Hg en productos de consumo animal está aumentando considerablemente.

A excepción del pescado, las concentraciones en la mayoría de alimentos son bajas. Pueden hallarse concentraciones superiores en los vegetales cultivados en suelos contaminados. Los productos cárnicos, principalmente las vísceras, pueden contener altos niveles de Hg. Así

se han publicado valores de presencia de Hg del orden de 1 a 136 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en riñón y entre 7 a 14 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en hígado de ganado vacuno.

I.3.3. Efecto antagonista selenio-mercurio

El efecto protector que el Se ejerce frente a la toxicidad del Hg se conoce desde hace más de tres décadas siendo descrito por primera vez por Parizek y Ostadalova (*Parizek & Ostadalova, 1967*). Estos investigadores demostraron la desaparición del efecto tóxico del mercurio cuando ambos compuestos Se^{4+} y Hg^{2+} eran administrados simultáneamente a ratas. Los riñones de estas ratas no mostraron variaciones a nivel macroscópico o daño histológico, como necrosis en los túbulos renales, a diferencia de lo que ocurría cuando sólo se les administraba Hg. Después de éstos, son mucho los estudios que han tratado este fenómeno, promoviendo un gran número de investigaciones sobre la posible interacción Hg-Se en distintos organismos y sistemas biológicos (*Ganther et al., 1972*). Recientemente, Li y colaboradores han llevado a cabo un estudio centrado en los residentes de zonas mineras con intoxicación por Hg inorgánico, comprobándose que la suplementación con dosis moderada de Se orgánico puede aumentar la excreción Hg en los residentes locales (*Li et al. 2012*).

Hay investigaciones que encontraron una relación molar 1:1 de Hg y Se en hígados de mamíferos marinos y aves. La correlación lineal entre estos elementos no fue sólo observada en animales marinos (*Nielsen & Dietz, 1990; Skaare et al., 1994; Storelli & Marcotrigiano, 1998; 2002*) sino en humanos expuestos ocupacionalmente al Hg (*Kosta et al., 1975*) y no expuestos (*Drash et al., 1996*). La relación equimolar se observó sólo cuando la concentración de Hg superaba un determinado valor, por lo que la presencia de ambos elementos puede proporcionar protección al animal debido al efecto protector del Se frente a la toxicidad causada por el Hg y viceversa. Sin embargo, los resultados encontrados en pescados, sugieren que la relación molar 1:1 no se mantiene a lo largo de la cadena trófica y es independiente de la relación molar de los eslabones inferiores de dicha cadena (*Dietz et al., 2000*).

En un estudio de exposición a MeHg realizado en ratones hembra en periodo de gestación, se observó que en aquellos individuos donde la dieta poseía menores concentraciones de Se, la mayor parte de la prole desarrollaba problemas neurológicos (*Watanabe et al., 1999*). En roedores cuya dieta es rica en antioxidantes como el Se y la vitamina

E la toxicidad provocada por el MeHg, que afecta al desarrollo y a la reproducción, se vio reducida (*Beyrouly & Chan, 2006*).

Las interacciones entre el Hg y el Se dependerán en gran medida, de las formas químicas en que ambos elementos se administren. Se han realizado un gran número de estudios que relacionan el efecto protector de los selenocompuestos frente a la toxicidad Hg. Estudios desarrollados por Fang para reducir los niveles renales de Hg, mostraron que si se comparan equimolarmente la eficiencia de los cuatro compuestos de Se, el orden de efectividad es el siguiente: SeMet > SeCys > selenato > selenito (*Fang, 1977*). Del mismo modo se ha comprobado que la exposición a MeHg en ratas provoca un incremento en porfirinas en la orina y un descenso de la actividad motora, efectos que se contrarrestaban mediante el suministro de SeMet (*Dos Santos et al., 2007*). Sin embargo, otro estudio revela que el selenito y selenato no afectan significativamente a la acumulación de Hg²⁺ o MeHg en diatomeas y mejillones, pero, la SeMet favoreció la bioacumulación del Hg inorgánico e inhibió significativamente la bioacumulación del MeHg (*Wang et al., 2004*).

A pesar de la gran variedad de estudios existentes y de la información disponible, los mecanismos exactos de interacción entre el Hg y el Se no se han conseguido dilucidar. La mayoría de la información disponible proviene de los resultados obtenidos de un gran número de estudios (*Culvin-Aralar & Furness, 1991; Juresa et al., 2005; Gailer et al., 2000*). En este sentido, se han propuesto diversos mecanismos para explicar las interacciones entre estos elementos:

Redistribución del Hg. La acción favorable del Se sobre la redistribución del Hg desde órganos más sensibles (riñones, sistema nervioso central) a otros menos sensibles (músculos), se debe a una competencia del Se por los mismos receptores. La presencia de Se puede suponer además la alteración del perfil proteico, favoreciéndose la formación de moléculas de elevado peso molecular que bloquean la unión del Hg a metaloproteínas (*Sørmo et al., 2011*).

Competencias por los mismos puntos de unión. Ambos elementos compiten por los mismos receptores, posiblemente receptores de Se. Es probable que estos receptores puedan ser ocupados por Hg en función de su biodisponibilidad en el ambiente (*Leonzio et al., 1982*).

Formación de complejos Hg-Se. En el plasma el selenito es reducido a seleniuro y reacciona con cloruro de mercurio para formar un complejo equimolar Hg-Se que se enlaza a la SeP, que sirve de protección frente a la movilización del Hg a otros tejidos (Yoneda & Suzuki, 1997; Sasakura & Suzuki, 1998; Gailer et al., 2000). En el hígado, moléculas de GSH se unen al HgSe para hacerlo soluble uniéndose el complejo resultante, la tiemanita, a una proteína específica (Ikemoto et al., 2004). En la figura 8 se representa el posible mecanismo de formación del complejo Hg-Se-SeP.

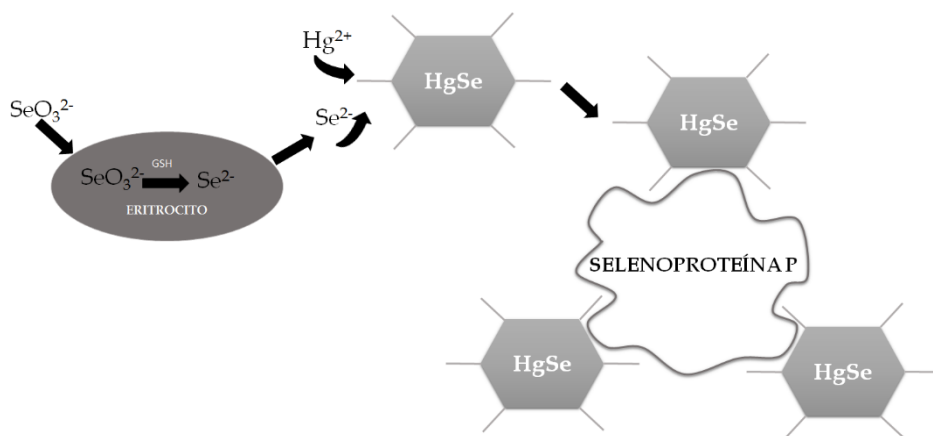


Figura 8. Formación del complejo Hg-Se-SeP. Esquema del posible mecanismo de formación del complejo Hg-Se-Selenoproteína P.

Conversión de las formas tóxicas de Hg en otras formas menos tóxicas. La transformación del MeHg en formas menos tóxicas por la presencia de Se puede ser uno de los posibles mecanismos de detoxificación. Aunque el mecanismo preciso de desmetilación no está definido, se ha sugerido que los radicales oxígeno pueden jugar un papel importante en este proceso (Yasutake & Hirayama, 2001; Farina et al., 2011).

Prevención del daño oxidativo. El pretratamiento con Se puede paliar el efecto inhibitor del MeHg sobre la GPx, asegurando la integridad de los componentes biológicos de las células y tejidos vía antioxidación (Yang et al., 2008).

II. Microalgas

Bajo el término microalga se hace referencia a aquellos microorganismos unicelulares (entre 1 y 50 μm) que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos que les permite llevar a cabo la función fotosintética produciendo oxígeno. Estos microorganismos pueden formar colonias o vivir como células individuales, habitan la práctica totalidad de los ecosistemas acuáticos, pudiendo encontrarse en suelos, rocas y plantas. Pueden crecer autotrófica o heterotróficamente con un amplio rango de tolerancia a diferentes temperaturas, salinidad, pH y disponibilidad de nutrientes (Hu et al., 2008; Brennan & Owende, 2010; Feng et al., 2011). Las microalgas contribuyen a casi el 50% del total de carbón orgánico fijado y poseen, además, un enorme potencial biotecnológico (Field, 1998; Wiffels et al., 2013).

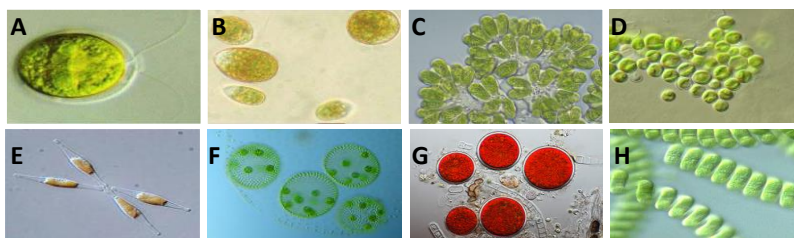


Figura 9. Variedad de microalgas más comunes. A: *Chlamydomonas reinhardtii*; B: *Dunaliella salina*; C: *Brothyococcus braunii*; D: *Chlorella vulgaris*; E: *Phaeodactylum tricornutum*; F: *Volvox carteri*; G: *Haematococcus pluvialis*; H: *Spirulina platensis*.

La biodiversidad de las microalgas es enorme, presentando una gran variedad de formas y tamaños, que abarca tanto la cianobacterias con estructura procariota, como las restantes microalgas de estructura celular eucariota (Figura 9). Se estima que existen entre 200.000-800.000 especies de microalgas, de las cuales hay identificadas más de 35.000 (Tabatabaei et al., 2011), cuya clasificación ha ido modificándose con el tiempo (South & Whittick, 1987; Ben-Amotz & Avron, 1990; Richmond, 1990; Henley et al., 2004).

Las microalgas se consideran los organismos fotosintéticos más eficientes ya que absorben más CO_2 y liberan más O_2 que cualquier planta, crecen de manera extremadamente rápida y llegan a acumular grandes cantidades de una gran variedad de productos. Algunas microalgas son capaces de doblar su biomasa durante la fase exponencial en periodos tan cortos como 3,5 h (Chisti, 2007).

La investigación con microalgas ha alcanzado una enorme importancia debido, fundamentalmente, a los numerosos usos que poseen. Se pueden utilizar con fines energéticos, principalmente para la obtención de biodiésel, aunque también se pueden obtener otros biocombustibles como bioetanol, biometano, biohidrógeno y generar calor y electricidad (Sheehan et al., 1998; Chisti, 2007; Wang et al., 2008; Hu et al., 2008; Li et al., 2008; Tredici, 2010; Mata et al., 2010; Grobbelaar, 2010; Wijffels et al., 2010; Singh et al., 2011; Amaro et al., 2011; Ghasemi et al., 2012; Ratha & Prasanna, 2012; Halim et al., 2012). Otras aplicaciones comerciales de las microalgas buscan la obtención de productos de alto valor añadido con aplicaciones en la nutrición (Becker, 2004; Pulz & Gross, 2004), salud humana (Richmond, 2004), acuicultura (Zmora & Richmond, 2004; Guevara et al., 2011), cosméticos (Raja et al., 2008) y un largo etcétera. Las microalgas pueden emplearse como biofertilizantes y acondicionadoras del suelo (Olaizola, 2003; Torres et al., 2008). Además, las microalgas pueden ayudar, durante su crecimiento, a reducir las emisiones de CO₂ por biomitigación biológica e intervenir en el tratamiento de aguas residuales (Pulz & Gross, 2004; Anjos et al., 2013). Los principales usos y aplicaciones de las microalgas, se resumen en la figura 10 mostrándose como ejemplo dos aplicaciones características.



Figura 10. Diferentes usos de las microalgas. A: alimentación animal en piscifactorías; B: biofertilizantes; C: biocombustible; D: suplemento alimenticio; E: cosméticos; F: tratamiento de aguas residuales.

II.1. Microalgas en la nutrición

Las primeras noticias acerca de la utilización de microalgas como alimento por el hombre se remontan al siglo XVI, cuando los cronistas del descubrimiento de América describen la elaboración de unos panecillos a partir de masas de algas que se recolectaban en el lago Texcoco y que utilizaba el pueblo azteca como alimento. Sin lugar a dudas se trataba de materia seca de la cianobacteria *Spirulina máxima* (García-González et al., 2003).

Desde la década de 1950 se han realizado intensos esfuerzos para explotar fuentes nuevas y alternativas de proteínas y suplementos alimenticios, con objeto de anticiparse a las necesidades de una población creciente con una carencia en la ingesta proteica. Los efectos beneficiosos de la biomasa de microalgas para la salud humana se basan en las propiedades de la gran variedad de compuestos bioactivos que éstas contienen:

Ácidos grasos poliinsaturados (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFAs), que actúan como potentes antioxidantes; especialmente, las series de los $\omega 3$ y $\omega 6$ como son el ácido eicosapentaenoico, el ácido docosahexaenoico o el ácido araquidónico (AA). Estos ácidos grasos están considerados farmacológicamente importantes por sus propiedades dietéticas y terapéuticas (Pulz & Gross, 2004). Se cree que poseen efectos positivos en enfermedades cardiovasculares, enfermedades coronarias, aterosclerosis, hipertensión, colesterol y tratamiento del cáncer (Mišurcová et al., 2011; Barrow et al., 2008).

Vitaminas, y carotenoides como β -caroteno (Ye et al., 2008), astaxantina (Choi et al., 2011), luteína (Semba & Dagnelie, 2003; Del Campo et al., 2007) o zeaxantina (Semba & Dagnelie, 2003), que poseen la capacidad de proteger frente al estrés oxidativo, causante de un amplio espectro de enfermedades y envejecimiento.

Esteroles. Se han encontrado microalgas capaces de producir diferentes tipos de esteroles, como el clionasterol producido por *Spirulina sp* que ha mostrado que puede incrementar la producción del factor activador del plasminógeno en células endoteliales vasculares y que facilita la prevención de enfermedades cardiovasculares (Barrow & Shahidi, 2008).

En la Figura 11, se muestran los principales pigmentos clorofilicos y carotenoides presentes en las microalgas.

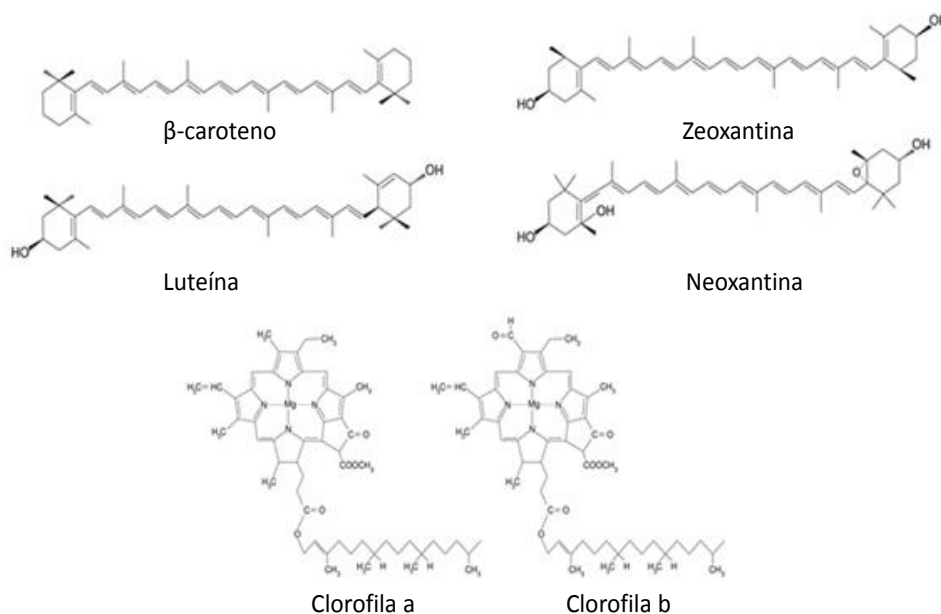


Figura 11. Estructura molecular de pigmentos clorofilicos y carotenoides principales en microalgas clorofitas.

Por otro lado, se ha demostrado la capacidad de algunas especies para producir compuestos terapéuticos (Richmond, 2004) con propiedades antibióticas, antiinflamatorias o antivirales. Un ejemplo muy conocido es el uso de la microalga *Spirulina*, como estimulante del sistema inmune, ayudando a prevenir infecciones virales y el cáncer (Barrow & Shahidi, 2008; Deng & Chow, 2010; Amaro et al., 2013). Las microalgas o sus derivados son utilizados también en la industria alimentaria como suplemento nutricional o como aditivos alimentarios (Becker, 2004; Pulz & Gross, 2004). Es muy conocido el uso de hidrocoloides extraídos de las algas como alginato, agar, y carragenanos utilizadas como agentes modificadores de la viscosidad en industria tanto alimentaria como farmacéutica (Barrow & Shahidi, 2008).

Las especies que mayoritariamente se cultivan para consumo humano son *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella*. Entre los beneficios citados del consumo de *Chlorella*, se encuentran el tratamiento de úlceras gástricas, acción preventiva frente a la arterioesclerosis e

hipercolesterol y actividad antitumoral. La *Spirulina (Arthrospira)* se utiliza por su elevado contenido proteico y su excelente valor nutricional; también es una fuente esencial de ácidos grasos y ácido linoleico que no pueden sintetizar los humanos. Mientras que *Dunaliella salina*, cuando crece en condiciones de alta salinidad e intensidad de luz, puede llegar a acumular altas concentraciones de β -caroteno.

El consumo de microalgas tiene especial aceptación en los países asiáticos donde desde los años 60 se comercializa con éxito el alga *Chlorella*, admitida como producto dietético-medicinal (*Richmond, 2004*). Hoy en día se estima que hasta un 75% de la producción mundial de microalgas se destina a la alimentación humana en forma de preparados en polvo, comprimidos, cápsulas y tabletas. El consumo humano de microalgas está restringido a unas pocas especies debido a las estrictas regulaciones de seguridad alimentaria, factores comerciales y demanda del mercado. Se han realizado estudios toxicológicos que demuestran su seguridad para el consumo, y actualmente algunas de estas microalgas están ya catalogadas por la FDA (*Food and Drug Administration*) norteamericana. En Europa, la explotación comercial para tal fin se encuentra sometida a estrictas normas de regulación, como la normativa europea EC 258/97.

Se estima que en pocos años el mercado de los alimentos funcionales supondrá un 20% de la facturación total de alimentos a nivel mundial. Los beneficios sobre la salud humana convierten a los productos basados de microalgas en aditivos de alto valor para la preparación de alimentos funcionales. Los extractos de microalgas se están utilizando en la preparación de yogures, pasta, pan y bebidas suaves en Alemania. Similares iniciativas se han emprendido en USA, Francia, Japón y China (*Becker, 2004*).

II.1.1. Microalgas en la nutrición animal

Los nuevos usos en la cría de ganado imponen el abandono progresivo de productos químicos, incluidos los antibióticos. En consecuencia, es necesario dedicar mayores esfuerzos a complementar los piensos animales con principios nutricionales naturales destinados a preservar y mejorar la supervivencia, el crecimiento, el desarrollo, la productividad y la fertilidad de los animales. Tras décadas de intentos, hoy en día puede asegurarse que el complemento de piensos animales contiene un 50% de biomasa de microalgas, rica en proteínas, procedente casi exclusivamente de *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina*.

Este complemento tiene efectos muy positivos para los animales, potenciando el sistema inmune (*Belay, 1993*).

Se puede destacar la acuicultura, donde la biomasa resulta de vital interés para el cultivo de bivalvos, que se alimentan mayoritariamente de microalgas, además de los estadios temprano de larvas de gambas y otros crustáceos, y de varias especies de zooplancton (artemias, rotíferos) que son a su vez la base para la alimentación de las larvas de peces (*Zmora & Richmond, 2004; Guevara et al., 2011*). Igualmente, los pigmentos presentes en muchas especies de microalgas incrementan el color rosado de los salmónidos y crustáceos (*Duerr et al., 1998; Jaime-Ceballos et al., 2004*). Las especies más empleadas como fuente alimenticia en acuicultura pertenecen a los géneros *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* y *Thalassiosira*. Su potencial procede de su facilidad de cultivo, su baja toxicidad, su tamaño adecuado para la ingesta, poseyendo una pared celular de alta digestibilidad y gran valor nutricional por su contenido en ácidos grasos insaturados y vitaminas (*Spolaore et al., 2006*).

II.2. Microalgas como sistema modelo de procesos biológicos

Las microalgas se han considerado como organismos modelo muy adecuados para el estudio de complejos procesos biológicos como la morfogénesis y diferenciación celular, el reconocimiento celular, los ritmos biológicos, la evolución de procesos y rutas metabólicas y la fisiología y bioquímica de la fotosíntesis. Por otro lado, en las microalgas se combinan propiedades metabólicas típicamente vegetales con características propias de células microbianas tales como la capacidad de crecimiento rápido en cultivo líquido, simplicidad de requerimientos nutritivos, plasticidad metabólica, tolerancia a condiciones extremas, capacidad de sintetizar y secretar algunos metabolitos y potencialidad de manipulación genética, que les confiere interés biotecnológico (*Borowitzka, 2013*).

El uso de microorganismos como bioindicadores aporta información con relevancia biológica, ya que proporciona datos sobre los efectos biológicos debidos a la exposición del metal tóxico, y que se pueden extrapolar a organismos vivos más complejos. Los microorganismos presentan, además, numerosas ventajas para ser usados como biosensores para evaluar la contaminación ambiental, ya

que están presentes en todos los hábitats y son capaces de metabolizar una amplia variedad de compuestos químicos. Además tienen una gran capacidad de adaptarse a condiciones adversas y desarrollar mecanismos de adaptación (*D'Souza, 2001*).

Gracias a su corto tiempo de división celular, se pueden obtener grandes poblaciones homogéneas en un corto intervalo de tiempo, y por tanto una respuesta amplificada para detectar el cambio producido por la presencia de un compuesto tóxico (*Gutiérrez et al. 2003*). Además, su manipulación en el laboratorio es relativamente sencilla, asequible y barato. Igualmente, pueden ser fácilmente modificados por manipulación genética, adquiriendo nuevas características que permitan optimizar el bioindicador en términos de sensibilidad y especificidad de respuesta. Mediante la manipulación genética es posible dirigir la respuesta del bioindicador a un tipo de contaminante o una clase de contaminantes determinada, así como modificar o introducir nuevos genes marcadores más fáciles de cuantificar.

Su pequeño tamaño hace posible que sean buenos sistemas para la miniaturización, pudiendo servir además como bioindicadores de múltiples compuestos. Por ejemplo, se pueden utilizar en paralelo para estudiar diversos contaminantes en distintas muestras ambientales, actuando de esta forma como bioindicadores con diferente especificidad de detección pero utilizando la misma señal marcadora. De esta forma actuarían como un “primer filtro” general de toxicidad (*Van der Meer et al. 2004*).

Las microalgas son muy sensibles a la toxicidad por metales pues afectan a casi todas las rutas de su metabolismo, crecimiento y diferenciación, por lo que son a menudo usadas como sensores biológicos para detectar potenciales efectos tóxicos de estos contaminantes. Estos organismos han desarrollado mecanismos para transformar los metales tóxicos en formas inocuas.

II.2.1. Mecanismos de tolerancia de los microorganismos y microalgas a los metales

Los microorganismos son capaces de soportar la toxicidad producida por los metales y acumular una elevada concentración de los mismos. En la tabla 3 se resumen algunas especies de microalgas que presentan capacidad de absorber metales pesados. La tolerancia a metales representa un proceso celular o fisiológico que impide, atenúa, reduce o elimina los efectos tóxicos inducidos por los metales. Se han

identificado diferentes mecanismos que protegen a las células y organismos frente a la intoxicación por metales. Estos mecanismos se basan en dos estrategias principales: eliminar la acumulación del metal y unir los metales a ligandos celulares que originen formas químicas inocuas.

Alga	Metal	Referencia
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	K, Mg, Ca, Fe, Sr, Co, Cu, Mn, Ni, V, Zn, As, Cd, Mo, Pb, Se	<i>Mahan et al., 1989</i>
<i>Chlorella salina</i>	Co, Zn, Mn	<i>Garnham et al., 1992</i>
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Ni	<i>Akhtar et al., 2004</i>
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cd, Pb, Cu, Ag	<i>Gin et al., 2002</i>
<i>Chlorella miniata</i>	Cr(VI)	<i>Han et al., 2007</i>
<i>Chorococcum sp</i>	Cd, Pb, Cu, Cd	<i>Gin et al., 2002</i>
<i>Cyclotella cryptica</i>	Al, Zn, Pb, Cu, Cd	<i>Schmitt et al., 2001</i>
<i>Lyngbya taylorii</i>	Pb, Cd, Ni, Zn	<i>Klimmek et al., 2001</i>
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Al, Zn, Pb, Cu, Cd	<i>Schmitt et al., 2001; Zhou et al., 1998</i>
<i>Porphyridium purpureum</i>	Al, Zn, Pb, Cu, Cd	<i>Schmitt et al., 2001</i>
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Cd, Pb, Cu, Ag	<i>Gin et al., 2002</i>
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Al, Zn, Pb, Cu, Cd	<i>Schmitt et al., 2001</i>
<i>Spirogyra sp</i>	Cr	<i>Gupta et al., 2001</i>
<i>Spirulina sp</i>	Cd	<i>Rangsayator et al., 2002</i>
<i>Spirulina platensis</i>	Cr	<i>Li Z.Y. et al., 2006</i>
<i>Stichococcus bacillaris</i>	K, Mg, Ca, Fe, Sr, Co, Cu, Mn, Ni, V, Zn, As, Cd, Mo, Pb, Se	<i>Mahan C.A. et al., 1989</i>
<i>Stigeodinium tenue</i>	Cd, Pb, Zn	<i>Pawlik-Skowronska B., 2001</i>

Tabla 3. Microalgas con capacidad de acumular metales.

Los principales mecanismos de tolerancia de los metales presentes en los microorganismos, en particular a las microalgas, son:

Unión del metal a la superficie celular, evitando de esta manera que el metal penetre en el interior de la célula. Se produce la captación inespecífica y pasiva de los iones metálicos por polímeros o estructuras de la superficie celular, evitando su penetración en la célula (*Garnham et al., 1992a;1992b*). Un claro ejemplo lo encontramos en la cianobacteria *Cyanidium caldarium*, adaptada a vivir en aguas de drenaje de minas con bajo pH y ricas en metales (Cu, Ni, Cr, Al). En estas condiciones, este microorganismo puede acumular metales hasta alcanzar el 20% del peso seco celular, incorporándose los metales a microcristales de sulfuros metálicos.

Cambios en la permeabilidad de la membrana, que alteran la incorporación del metal (*Mason & Jenkins, 1995*). La incorporación de metales esenciales obedece en la mayoría de los casos a una cinética de saturación, lo que indica un mecanismo de transporte mediado por un transportador. Así, la entrada de metales esenciales o no esenciales puede ser mediada por transportadores poco específicos o por difusión pasiva (tanto mediada por transportador como sin él). Los cambios en la composición y la estructura de la membrana pueden prevenir la incorporación pasiva de algún metal o al menos reducir su entrada. Las cepas del alga parda filamentosa *Ectocarpus siliculosus*, resistentes al Cu, son capaces de eliminar grandes concentraciones de este metal, efecto “fouling” (*Mason & Jenkins, 1995*).

Complejación de los iones metálicos mediante la excreción de metabolitos al medio. Es un hecho muy conocido que muchos organismos liberan cantidades significativas de compuestos capaces de quelatar o precipitar los metales (SH₂, oxalato, ácidos orgánicos, aminoácidos, péptidos, polisacáridos, compuestos fenólicos). Algunas especies de microalgas (*Euglena gracilis, Scenedesmus quadricauda, Chlorella vulgaris*) tienen la capacidad de reducir la incorporación del Cu limitando la concentración del ion cúprico en la superficie del agua de mar mediante la excreción de compuestos ligantes de este elemento.

Los metales también se pueden acumular en gránulos o vacuolas (*Klerks & Bartholomew, 1991*). Estos gránulos suelen ser de mayor densidad que las estructuras celulares que los rodean y varían en forma, composición y localización. El almacenamiento de metales en determinados orgánulos donde no se produzcan reacciones metabólicas importantes, constituye también un mecanismo para impedir el contacto de los metales con las dianas celulares. Así, la microalga *Scenedesmus acutiformis* acumula el Cu principalmente en sus vacuolas.

Alteraciones del metabolismo celular. Existe la posibilidad de que un proceso metabólico sensible a algún metal no se vea afectado gracias a que se activa una ruta metabólica alternativa. Asimismo, se puede incrementar la síntesis de una enzima para contrarrestar la pérdida de la que se reduce como consecuencia de la unión al metal tóxico. Otro mecanismo es el cambio de la estructura de la enzima que reduzca la afinidad por el metal (*Seiler et al., 1988*).

Desarrollo de mecanismos de transporte activo que mantengan los niveles de metal a bajas concentraciones intracelulares. Estos sistemas eliminan el exceso de metal mediante bombas de

transporte que pueden ser más o menos específicas o mediante la excreción del metal en forma de complejos moleculares (Waiwood *et al.*, 1987; Rea *et al.*, 1998).

Modificación química del ión metálico. Mediante procesos metabólicos celulares el ión metálico es transformado a una forma menos tóxica, siendo las modificaciones más comunes la reducción o la metilación (Sunda & Gessner, 1989). Así, la *Chlamydomonas* reduce enzimáticamente el Hg^{+2} a Hg^0 que es volátil y algunas cianobacterias reducen el Cr^{+6} y As^{+5} a las formas menos tóxicas.

Unión de metales a ligandos celulares. Consiste en la inmovilización citoplasmática de los cationes metálicos mediante su unión a una molécula ligando y la posterior compartimentalización del complejo molécula ligando-metal. Finalmente el complejo metal-ligando es eliminado de la célula como complejo no tóxico. Moléculas como malato, citrato, polifosfato, GSH, diversos aminoácidos y las fitoquelatinas se han identificado como agentes quelantes intracelulares en microalgas (Mason & Jenkins, 1995).

En la figura 12 se esquematiza los principales mecanismos de detoxificación de metales pesados utilizados por microorganismos.

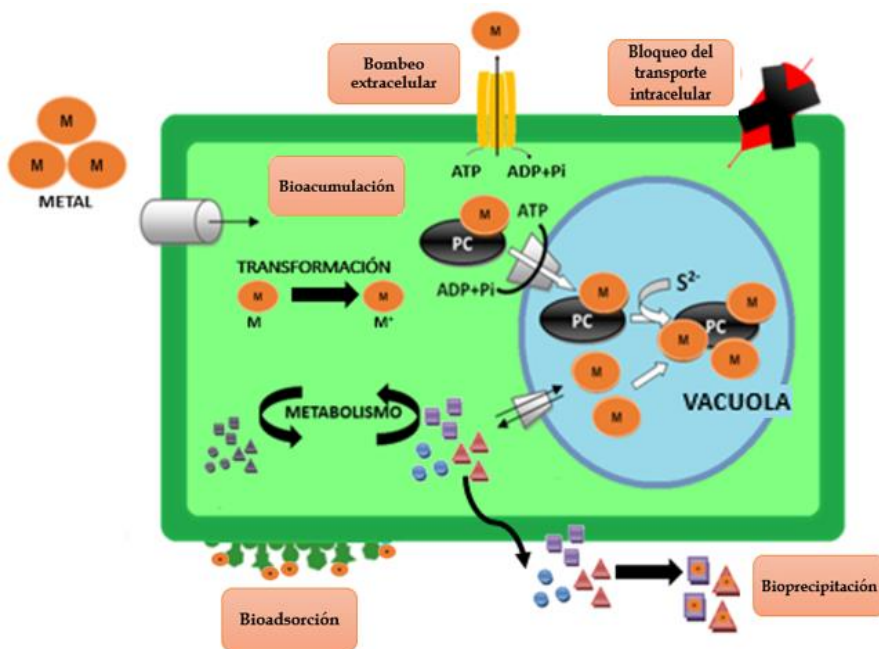


Figura 12. Mecanismos de detoxificación de metales pesados presentes en microorganismos.

II.2.1.1. Moléculas quelatantes de metales pesados: Fitoquelatinas

Las fitoquelatinas son polipéptidos integrados por el péptido γ -glutamilcisteína con un solo residuo carboxi-terminal de glicina (Gly) presentando la estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde n varía de 2 a 11. Aunque la mayoría de especies biológicas donde se han aislado fitoquelatinas, éstas presentan la Gly como aminoácido terminal, se han identificado otras variantes estructurales en este aminoácido es sustituido por serina, β -alanina o glutámico (Rauser, 1995; Zenk, 1996). Asimismo, es frecuente la aparición de las denominadas fitoquelatinas desgliciladas que no presentan aminoácido terminal. Se identificaron por primera vez en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Kondo *et al.*, 1984) y después en plantas (Grill, 1985). Se agrupan en 5 familias, y se han encontrado en todas las plantas examinadas, algunas especies de levaduras y hongos filamentosos, y en algunas especies de microalgas (Grill, 1985; Kneer *et al.*, 1992).

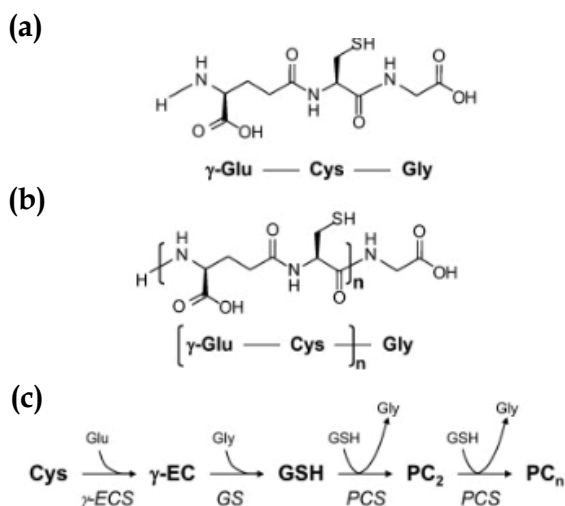


Figura 13. **a.** Estructura química del GSH, **b.** estructura química de fitoquelatina ($n=2-6$) y **c.** vía de síntesis de fitoquelatinas canónicas de Glu, Cys, Gly y a través de γ -Glu-Cys (-EC) y GSH.

Las fitoquelatinas son sintetizadas enzimáticamente a partir del GSH por la enzima fitoquelatín sintasa (γ -glutamilcisteiniltransferasa), en respuesta al estrés por metales pesados. El mecanismo catalítico es un mecanismo de sustitución enzimática (Figura 13). La enzima presenta dos sitios de unión y acilación a los sustratos: uno de alta y otro de baja afinidad por el GSH (Vatamaniuk *et al.* 2000). La Cys es

indispensable para la síntesis de fitoquelatinas, y representa el primer sitio de acilación; mientras que el segundo sitio probablemente se localiza en el dominio C-terminal (Clemens, 2006; Rea, 2006). En primer lugar se produce un ataque nucleofílico de la Cys sobre el C carbonílico del GSH, formándose el producto intermedio γ Glu-Cys~acil-enzima y liberándose la Gly del GSH. Estos dos pasos son independientes de la presencia del metal en el medio. En presencia del metal se da también la unión de la molécula aceptora, GSH, o mediante fitoquelatina formada por n repeticiones del dipéptido g-Glu-Cys (FQn) al segundo sitio de la acilación de la enzima (Rea et al. 2004). Se produce entonces el ataque nucleofílico de la molécula aceptora sobre el intermediario γ Glu-Cys~acil-enzima, resultando así la reacción de transpeptidación que comporta la síntesis de fitoquelatinas.

Las fitoquelatinas son sintetizadas intracelularmente en respuesta a la presencia de altas concentraciones de metal. La síntesis de fitoquelatinas puede ser inducida por una gran variedad de metales entre los que pueden mencionarse Ag, Au, Bi, Cd, Cu, Hg, Pb y Zn (Schat et al., 2002). Sin embargo, distintos estudios muestran que el Cd es el mejor inductor de la síntesis de estos péptidos. En la figura 14 se representa el mecanismo de detoxificación del Cd en diferentes organismos.

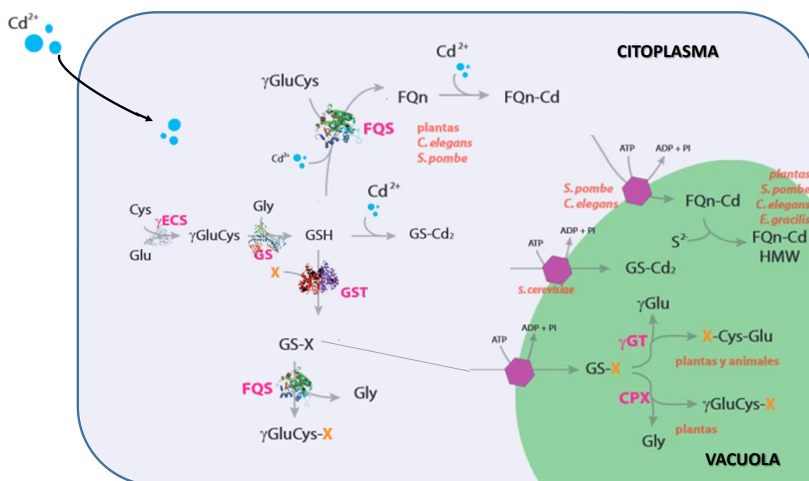


Figura 14. Representación esquemática del metabolismo celular del GSH en distintos organismos mediante exposición a Cd.

El Cd debe unirse a GSH o FQn, para formar complejos tiolato-metal que se unan a la enzima fitoquelatin sintasa (FQS) activándola. Las fitoquelatinas sintetizadas en el citosol quelatan los iones de Cd,

formando los complejos Cd-FQn de bajo peso molecular, que se acumulan en las vacuolas. Dentro de éstas, los complejos Cd-FQn se combinan entre sí, uniéndose a más Cd y formando los complejos Cd-FQn de alto peso molecular, que además están estabilizados por átomos de azufre (Cobbett, 2000) (Figura 14). En plantas y levaduras se ha comprobado la acumulación de estos complejos en vacuolas.

No cabe duda de que las fitoquelatinas presentan un importante papel en la detoxificación de metales. La contaminación ambiental por la exposición a grandes cantidades de metales como Hg, Cd o As, es un fenómeno relativamente reciente debido a los vertidos del hombre en los procesos industriales (Cazale & Clemens, 2001). Por tanto, cabe preguntarse si esto puede haber representado una presión evolutiva suficiente para mantener los genes fitoquelatinas en todo el reino vegetal y otros organismos, muchos de los cuales no presentan fitoquelatinas. Se han propuesto otras funciones alternativas de estas moléculas, como su papel en la homeostasis de metales esenciales y en el metabolismo del Fe y del S (Zenk, 1996; Sanita di Toppi & Gabrielli, 1999). Sin embargo, actualmente no hay evidencias directas de que las fitoquelatinas tengan funciones diferentes a la detoxificación de metales.

II.2.2. Exposición de *Chlorella sorokiniana* a mercurio

El rápido crecimiento de los cultivos de microalgas hace posible llevar a cabo experimentos de exposición a diferentes elementos y sus especies, que permiten estudiar procesos de interacción entre los mismos. Las algas son capaces de acumular metales pesados en concentraciones de varios órdenes de magnitud superiores a las que las rodea, y pueden secuestrarlos mediante mecanismos idénticos a las plantas superiores (Walter & Grill, 1988).

Los metales pesados, dependiendo de su estado de oxidación, son elementos altamente reactivos y, por ello, perjudiciales para la mayoría de los organismos. Por ejemplo, el Cd, Hg, Ni, Zn o Pb pueden reemplazar al Mg en la molécula de clorofila en el centro de reacción del fotosistema II provocando una pérdida de funcionalidad (Küpper *et al.*, 1996; 1998). No obstante, la mayoría de los efectos tóxicos de los metales parecen estar relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno y el consiguiente desbalance provocado en las reacciones redox celulares. Las microalgas responden al estrés causado

por los metales pesados aumentando la actividad de enzimas SOD, catalasa, GPx y ascorbato peroxidasa, y produciendo compuestos de actividad antioxidante como los carotenoides (*Lionetto et al., 2012; Lefevre, 1964*).

En concreto, la *Chlorella* es capaz de fijar metales como, Hg, Cd, Zn, Cu y Pb, por lo que ha sido utilizada en sistemas de tratamiento de aguas residuales para reducir contaminación por metales pesados. Además se han realizado experiencias en animales en las que la *Chlorella* se ha empleado de forma satisfactoria para detoxificar Cd y dioxinas en animales (*Nagao et al., 1983; Morita et al., 2001*).

El cloruro de mercurio y el MeHg son extremadamente tóxicos para especies como *Poteroochromonas malhamensis*. El MeHg afecta a la citocinesis y la mitosis de las algas y conduce a la formación de las células de núcleos múltiples, así como varias alteraciones en la estructuras (*Röderer, 1983*). La respuesta a cloruro de mercurio en las algas difiere entre especies, pudiendo citarse entre las más sensibles la *Microcystis aeruginosa*, y entre las menos la *Chlorella vulgaris* (*Juneau et al., 2001*).

Diversos investigadores han estudiado algas con mecanismos de eliminación de Hg extracelulares. Paisio y colaboradores observaron que diferentes especies pertenecientes a los géneros *Secnedesmus*, *Chlorella* y *Oscillatoria* fueron capaces de adsorber Hg (entre 10-40% de 100 mg·L⁻¹) (*Paisio et al., 2012*). Recientemente, Imani y colaboradores estudiaron la capacidad de *Dunaliella*, para tolerar y eliminar Hg²⁺, demostrando por primera vez que esta alga toleró y adsorbió 67% de 30 mg·L⁻¹ de Hg²⁺ en una hora (*Imani et al., 2011*). Algunos investigadores, han estudiado la eliminación de Hg²⁺ en disolución por un sistema de algas inmovilizadas en alginato, tanto en cultivos *Chlamydomonas reinhardtii* como en *Chlorella emersonii*. En algas inmovilizadas la acumulación de Hg²⁺ fue mayor que en células libres (*Bayramoğlu et al., 2006; Bashan & Bashan, 2010*). Por otro lado, Lim y colaboradores demostraron la capacidad de *Kappaphycus alvarezii* para eliminar Hg en ambientes marinos. En este sentido, después de 5 días exposición a Hg se observó la acumulación de Hg intracelular, y remoción del contaminante en el medio acuoso, posiblemente debida a mecanismos de intercambio iónico (*Li et al., 2011*).

III. Desarrollo de alimentos funcionales

Durante los últimos años la percepción que la industria y el consumidor tenían de los alimentos se ha modificado sustancialmente. La “nutrición adecuada”, entendida como suficiente y dirigida a evitar déficits, ha dejado de ser la meta en las sociedades desarrolladas. Emerge la concepción de la alimentación como nutrición óptima, es decir, aquella que no sólo aporta las necesidades energéticas y nutricionales básicas, sino que también proporciona beneficios fisiológicos adicionales. La nutrición adquiere un nuevo enfoque terapéutico y preventivo, participando en la promoción de la salud. El reto del futuro es la nutrición a la carta, diseñada a medida de los factores genéticos y medioambientales que constituyen y moldean al ser humano (*Silveira-Rodriguez et al., 2003*).

III.1. Alimento Funcional

Los avances científicos en disciplinas como la biología molecular, las tecnologías en la nutrición y la importancia que el consumidor otorga a la salud, proporcionan a la industria alimentaria puntos de partida para el diseño y desarrollo de alimentos funcionales (*Palou & Serra, 2000*), a través de la incorporación de nuevos ingredientes o productos naturales en dichos alimentos, que debido a su particular composición tienen efectos protectores a ciertas patologías.

El concepto de alimento funcional surgió en Japón a principios de los años 80, con objeto de reducir el costo de los seguros de la salud que aumentaban por la necesidad de proporcionar cobertura a una población cada vez de mayor edad. El abordaje científico de la alimentación funcional en Europa tiene su punto de partida en un grupo de trabajo promovido por la Sección Europea del *International Life Sciences Institute* (ILSI). El proyecto se tituló *Funcional Food Science in Europe* (FUFOSE) y su objetivo era proponer una serie de conceptos y definiciones de consenso en relación a este tema (*Roberfroid, 2002*).

Se definió alimento funcional como “aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable. Los alimentos funcionales no dejan de

ser alimentos y deben demostrar sus efectos en las cantidades que se consideren normales para su consumo en la dieta: no se trata de pastillas o píldoras, sino que forman parte de los hábitos alimenticios normales. Un alimento funcional puede ser un alimento natural o un alimento en el que el componente haya sido añadido/retirado tecnológica- o biotecnológicamente. También puede ser un alimento en el que la naturaleza o la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes hayan sido modificados, o cualquier combinación de estas opciones. Un alimento funcional puede serlo para todos los miembros de una población o para un grupo específico, que puede estar definido, por su edad o constitución genética (*Diplock et al., 1999*).

No se trata de una definición cerrada y definitiva sino más bien una forma de describir y delimitar convenientemente el concepto, de modo que permita trabajar científicamente sobre una base precisa. Algunos aspectos importantes a destacar (*Arai et al., 2001; Roberfroid, 2002*) son:

- El efecto funcional es distinto que el nutritivo.
- Debe demostrarse satisfactoriamente. Por sí solas las transformaciones en los alimentos no confieren necesariamente el carácter de funcional, sino que ese efecto debe demostrarse expresamente en cada caso.
- Puede consistir en mejora de funciones fisiológicas o en la reducción del riesgo de desarrollar una determinada enfermedad.
- Se trata de un alimento, no de una píldora o cápsula, y debe consumirse como parte de la dieta normal.

Los procedimientos para obtener alimentos funcionales son diversos como por ejemplo: técnicas de suplementación y/o enriquecimiento, modificación o formulación de productos. En el desarrollo de estos nuevos alimentos es necesario garantizar que dichos ingredientes incorporados previamente en la matriz alimentaria estén activos biológicamente a nivel gastrointestinal para asegurar su adecuada absorción y, consecuentemente, su efecto beneficioso para la salud (*García-Barrera T. et al., 2015*).

Uno de los principales objetivos de la ciencia de los alimentos funcionales es identificar las interacciones beneficiosas entre un alimento, o ingredientes específicos, y una o más funciones del organismo, obteniendo, si es posible, las pruebas definitivas acerca de los mecanismos que intervienen en la interacción. Este objetivo

principal debe estar basado en las investigaciones *in vitro* o *in vivo* en líneas celulares o tejidos de cultivo, más adelante en modelos animales y, finalmente, deben ser corroborados con estudios en humanos.

El desarrollo de estos alimentos es una de las áreas de mayor crecimiento científico dentro del campo de la tecnología alimentaria y biotecnología como lo refleja el hecho que, desde el año 1970 hasta el día de hoy se han publicado más de 5600 artículos relacionados con esta temática, el 80% de ellos en los últimos 10 años.

III.2. La microalga *Chlorella* como alimento funcional

Considerando la enorme biodiversidad que presentan las microalgas, estos organismos representan una importante fuente natural de principios activos de gran valor en el desarrollo de nuevos productos y aplicaciones, ya que pueden ser usadas en primera instancia para la producción de ingredientes de alto valor añadido y en segundo lugar como biomasa propia (*starters*) para el inicio de procesos de bioproducción. Por estos motivos, la caracterización de extractos y compuestos procedentes de estas especies de microalgas aptas para la alimentación humana y animal, podría ser una buena estrategia en el desarrollo de alimentos funcionales específicos.

Debido a su elevada eficiencia energética (*Belasco, 1997*), se ha llegado a plantear el uso de la *Chlorella* como fuente de energía y alimento, resultando en este caso de interés por su alta proporción de proteínas y otros nutrientes esenciales para el ser humano. En peso seco contiene en torno a 45% de proteínas, 20% de grasas, 20% de carbohidratos, 5% de fibra y 10% de minerales y vitaminas (*Becker, 2007*).

A finales de los años 40, se pensó que *Chlorella* podría ser una nueva y prometedora fuente de alimento que podría dar solución a la crisis mundial en este campo. Por lo que se proyectó producir grandes cantidades de alimento de buena calidad a un coste relativamente bajo (*Belasco et al., 1997*). En la actualidad *Chlorella* es comercializada por empresas que promueven sus efectos como “superalimento” o suplemento dietético, atribuyéndole propiedades para el control del peso, prevención del cáncer o mantenimiento del sistema inmunológico, entre otras (*Belasco et al., 1997*). La sustancia más importante obtenida a partir de *Chlorella* es el β -1,3-glucano, activo inmunoestimulante protector frente a los radicales libres, que reduce los niveles de lípidos sanguíneos (*Jong-Yuh & Mein-Fen, 2005*).

Se han realizado numerosos estudios sobre los efectos beneficiosos de esta microalga (Konishi et al., 1985). Algunos estudios realizados en ratones demostraron que la administración de *Chlorella* podría tener efectos antitumorales y de control de la hipertensión (Tanaka et al., 1984; Sansawa et al., 2006). Este alga es de interés fundamentalmente por su contenido en β -1,3-glucano, el cual es un aditivo inmunoestimulador que actúa como colector de radicales libres y reductor del contenido en lípidos de la sangre. También hay evidencias de su eficacia en el tratamiento de úlceras gástricas, y resfriados, prevención de la arteriosclerosis e hipercolesterolemia y tiene acción antitumoral. Además de esto, la *Chlorella* se utiliza frecuentemente como aditivo alimentario por su sabor y acción colorante (Yamaguchi, 1997; Gouveia, 1997). Dichas microalgas se han preparado microencapsuladas para conseguir que su efecto inmunomodulador comience en el estómago (Gimferrer, 2013).

III.2.1. La microalga *Chlorella sorokiniana* enriquecida en yodo como alimento funcional

Se ha postulado que la yodación podría realizarse a través del agua de consumo humano y animal, pero supone un coste elevado (Cao et al., 1994). El pan cocinado con sal yodada se ha utilizado como sistema de yodación en varios países de manera exitosa (Wiersinga et al., 2001; Horton, 2006). Hay estudios pilotos donde se han yodado hortalizas o se ha utilizado el azúcar como vehículo portador, con buenos resultados (Horton, 2006; Tonacchera et al., 2013; Eltom et al., 1995). Actualmente, se dispone en España de preparaciones farmacéuticas con yoduro potásico para administrar a las madres embarazadas y lactantes y que pudieran ser una alternativa para los niños que presenten una deficiencia grave del elemento, a pesar de realizar una ingesta adecuada de sal yodada. Las leches de fórmula están enriquecidas con yodo y contienen, al menos, 100 μ g de yodo por litro de leche.

Las algas se encuentran entre los organismos que concentran las mayores cantidades de este halógeno, sin embargo, se conoce poco sobre las distintas formas químicas en las que se encuentra y sobre su biodisponibilidad. Yoduro y yodato son las especies de yodo inorgánico más habituales en el agua de mar (Campos et al., 1996) que pueden dar lugar a la formación de compuestos orgánicos halogenados volátiles (Manley, 2002) cuyas fuentes principales son las algas pardas y el fitoplancton marino (Moore et al., 1996; Manley & Cuesta, 1997; Leblanc et al., 2006; Kupper et al., 2008),

y también pueden incorporarse a una variedad de moléculas, desde complejas glicoproteínas (Kingsley et al., 2001) a simples ácidos grasos o aminoácidos (Dembitsky & Srebnik, 2002).

Algunos autores han revisado las especies de yodo en muestras ambientales y biológicas (Edmons & Morita, 1998; Gribble, 2003). Entre los compuestos yodados presentes en algas, se encuentran los yodoalcanos de estructura simple tales como CH_3I , CH_2I_2 , CHI_3 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{I}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$, etc; y otros compuestos orgánicos yodados como 1-yodo-3,3-dibromo-2-heptano o multihalogenados lactonas. Hou y colaboradores han estudiado la concentración y especiación de yodo en la fracción soluble en distintos tipos de muestras, encontrando variabilidad en el contenido de yodo soluble entre 18-99% en las muestras estudiadas, siendo el yoduro la especie mayoritaria con porcentajes de 61 hasta 93% (Hou et al., 1997). Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (Martinelango et al., 2006; Shah et al., 2005; Wang et al., 2008). La concentración de yodato es baja y la concentración de compuestos orgánicos de yodo varía entre 5 y 37%. En un trabajo posterior, Hou y colaboradores estudiaron macromoléculas que contienen yodo, tales como proteínas, pigmentos, polifenoles y polisacáridos como fucoidan y algina, por diferentes procedimientos de fraccionamiento y llegaron a la conclusión de que el yodo se une principalmente a proteínas, en mayor medida a pigmentos y polifenoles y en menor medida a polisacáridos (Hou et al., 1999). En trabajos anteriores, se ha demostrado la presencia de proteínas que contienen yodo en diferentes tipos de algas marinas en forma de aminoácidos yodados tales como MIT, DIT, T2 y T4 (Rousset et al., 1989).

Se cree que altas concentraciones de yodo son tóxicas para el crecimiento de las algas. Sin embargo, varias especies como *Bellerochea* sp., *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Skeletonema costatum* y *Tetraselmis* sp presentan altas tolerancias al yodo presente en el medio, y especies como *Emiliana huxleyi*, *Gephyrocapsa oceánica*, muestran respuestas de crecimiento positivo (Iwamoto & Shiraiwa, 2012). Las macroalgas pardas y rojas son conocidas por acumular altas concentraciones de yodo, en particular el alga parda *Laminaria digitata*, con un porcentaje de máxima acumulación cercano al 5% del peso seco, en la que presenta un papel antioxidante (Küpper et al., 2008). Otras especies como, *Petalonia fasciata* requiere yodo para el crecimiento, la morfogénesis y la reproducción (Hsiao, 1969). También se requiere yodo para la el crecimiento del alga parda *Ectocarpus fasciculatus* (Pedersen, 1969) y el alga roja

Polysiphonia urceolata (Fries, 1966). Por otro lado, se ha publicado la inhibición del crecimiento del alga *Ectocarpus fasciculatus* (Pedersen, 1969) y del alga roja *Goniotrichum elegans* (Fries, 1966) debido al contenido de yodo en el medio.

Recientemente se ha descrito la capacidad de las microalgas marinas para incorporar yodo del medio que las rodea (Fuse *et al.* 1989; De la Cuesta & Manley, 2009) y acumularlo principalmente en forma de yoduro. Las microalgas con mayor tasa de acumulación de yoduro son las diatomeas (De la Cuesta & Manley, 2009). En algunos trabajos se ha demostrado que este yodo (yoduro o yodato) no afecta al crecimiento de las microalgas a concentraciones inferiores a 1 μM (Fuse *et al.*, 1989), ni a la composición bioquímica celular, concretamente al perfil de ácidos grasos (Zheng *et al.*, 2005). Aunque todavía se necesitan más estudios para revelar si el yodo tiene un papel esencial en las células de las microalgas. El mecanismo por lo que se acumula el yodo en estos microorganismos no es bien conocido, aunque en diatomeas (*Porosira glacialis*) se ha descrito la oxidación del yoduro a ácido hipoyodoso mediante una bromoperoxidasa extracelular, residente supuestamente en el apoplasto (Hill & Manley, 2009), lo que hace sospechar la existencia de un mecanismo de incorporación de yodo similar al de las macroalgas descrito por Küpper *et al.* (1998).

Otra especie química de yodo que también es incorporada por las microalgas es el yodato (De la Cuesta & Manley, 2009; Moisan *et al.*, 1994) aunque no se conoce el mecanismo de incorporación del mismo. Una posibilidad es la incorporación como yoduro después de reducir el yodato. De hecho, se han descrito numerosos casos de reducción de yodato en microalgas (Wong *et al.*, 2002; Waite & Truesdale, 2003; Hung *et al.* 2005; Chance, *et al.* 2007; Bluhm *et al.* 2010). Este mecanismo de reducción podría consistir en la reacción mediada por nitrato reductasa, tal y como propusieron Tsunogai & Sase (1969) para bacterias cuando las concentraciones de nitrato no son altas en el medio. Sin embargo, también se ha apuntado que el nitrato y el yodato no comparten una vía de reducción enzimática común (Truesdale & Bailey, 2002; Waite & Truesdale, 2003). Waite y Truesdale (2003) sugieren que esta reducción del yodato se produzca por el efecto de la intensidad de luz. El yodato se utilizaría como aceptor de los electrones en exceso para evitar la fotoinhibición del PSII (Lomas & Glibert, 1999; Waite & Truesdale, 2003) que se produce cuando otras vías de disipación de energía absorbida (ejemplo: xantofilas) (Olaizola & Yamamoto, 1994; Demming-Adams & Adams III, 2002) son insuficientes

para balancear el flujo de electrones dentro de la célula sin producir daños.

Burianová y colaboradores han estudiado la acumulación de yodo en microalga para su aplicación como suplemento alimenticio, ya que pueden acumular hasta 500 mg de I por kg, principalmente en la fracción soluble en forma de yoduro (*Burianová et al., 2005*). Por ello, las algas y microalgas se están convirtiendo en un alimento verde bien recibido y también en la principal fuente de yodo en la dieta.

III.2.2. La microalga *Chlorella sorokiniana* enriquecida en selenio como alimento funcional

La presencia de productos nutracéuticos basados en la presencia de Se se ha multiplicado recientemente. En particular destacan los preparados multiminerales que contienen Se junto a otros elementos trazas y vitaminas, y los suplementos preparados a partir de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Las posibilidades de *Saccharomyces cerevisiae* como suplemento alimentario se deben a su elevada capacidad para incorporar Se como consecuencia de su elevado contenido en proteínas y la ventaja de producir el alimento a partir de levadura en lugar de utilizar plantas enriquecidas en este elemento. Generalmente, la *Saccharomyces cerevisiae* asimila Se a partir de Na_2SeO_3 y lo incorpora como SeMet en las proteínas, de manera análoga a las plantas (*Demirci & Pometto, 1999; Polatajko et al., 2004; Dumont et al., 2005*).

Debido a la capacidad de *Chlorella* para asimilar Se inorgánico y metabolizarlo produciendo especies orgánicas de este elemento, se han realizado multitud de experiencias estudiando sus posibilidades en diversos campos. Svoboda y colaboradores, suplementaron cerdos con *Chlorella* enriquecida en Se, concluyendo que la biodisponibilidad del Se en *Chlorella* enriquecida en este elemento es mayor que para el selenito de sodio, obteniéndose concentraciones significativamente mayores de Se en tejido muscular (*Svoboda et al., 2009*). Ševčíková y colaboradores enriquecieron la dieta de pollos con *Chlorella* enriquecida en Se, $0,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, observando mejora de la estabilidad oxidativa de la carne comparado con la adición de selenito de sodio, y el incremento de la concentración de este elemento en el músculo (*Ševčíková et al., 2006*).

El contenido de Se en la yema de huevo y el peso de los mismos, incrementó significativamente en los estudios realizados por Skrivan, cuando emplearon *Chlorella* enriquecida en Se como suplemento

alimentario en las dietas de gallinas ponedoras (*Skrivan et al., 2006*). El contenido de Se y α -tocopherol en pechuga y muslo de pollos aumenta significativamente cuando se suplementan con levaduras o *Chlorella* enriquecidas con Se en comparación con el selenito de sodio; concluyéndose que las fuentes orgánicas de Se en la dieta de las gallinas ponedoras y de engorde podría mejorar las condiciones nutricionales de los productos, huevos y carne, para consumo humano (*Skrivan et al., 2008*).

Otros estudios consideran la respuesta de la actividad de la GPx en ovejas y corderos de animales alimentados con una suplementación de Se utilizando *Chlorella* como vehículo y comparan los resultados con la suplementación mediante Se inorgánico. Los resultados demuestran que el número de nacimientos aumenta en los animales suplementados con la forma orgánica de Se contenida en la microalga, aumentando la actividad de GPx en sangre y aumentando la concentración de Se en el suero sanguíneo y la leche de las ovejas (*Travnicek et al., 2007; 2008*).

Otros resultados a destacar, son los obtenidos por Doucha y colaboradores, quienes tras un experimento con cerdas concluyeron que, frente a la suplementación con Se inorgánico, la adición de biomasa de *Chlorella* enriquecida en Se incrementaba la producción de leche de las cerdas y mejoraba los principales parámetros reproductores, principalmente el número de lechones destetados (*Doucha et al., 2009*).

III.2.2.1 Bioacumulación y biotransformación de selenio en microalgas

Las microalgas pueden incorporar Se fácilmente a partir del medio de cultivo o medio ambiente acuático, así como transformarlo en varios compuestos orgánicos de Se. El selenato es la forma inorgánica con la que las microalgas pueden incorporar Se con mayor facilidad, pero este proceso depende de la especie, así como la capacidad de tolerar, acumular y transformar Se. Como sucede para el resto de los elementos, los cambios experimentados por el Se en las microalgas dependen, entre otros factores de la especie de microalga. Si la concentración de Se es alta, la acumulación del Se por la microalga puede producir disminución de la tasa de crecimiento, inhibición de la fotosíntesis y daños estructurales celulares (*Morlon et al., 2005a; 2005b; Geoffroy et al., 2007; Vítová et al., 2011*).

Se han realizado varios experimentos de exposición a Se en microalgas a concentración mucho más altas de la que se encuentra este elemento en la naturaleza (Morlon et al., 2005a; 2005b; 2006; Geoffroy et al., 2007; Umysová et al., 2009; Fournier et al. 2010; Vítová et al., 2011; Gojkovic et al., 2013; 2014; Li et al., 2003). Wrench fue pionero en publicar el efecto que produce la exposición de Se en microalgas marinas, *Tetraselmis tetrathele* y *Dunaliella minuta* (Wrench, 1978). Un estudio posterior estudió el efecto en seis algas marinas incluyendo *Chlorella sp.*, *Primolecta Dunaliella*, *Tetraselmis chuii*, dos especies de género *Platymonas* así como un alga roja *Porphyridium cruentum* (Wheeler et al., 1982). Bennett describió el efecto de Se en *Chlorella pyrenoidosa* cultivada en un biorreactor continuo (Bennett, 1988). Publicaciones recientes se centran en estudiar el efecto en *C. reinhardtii* (Morlon et al., 2005; Geoffroy et al., 2007; Fournier et al., 2010) *S. quadricauda* (Umysová et al., 2009; Vítová et al., 2011), *Dunaliella salina* (Reunova et al., 2007) así como en la macroalga *Ulva sp* (Schiavon et al., 2012).

El metabolismo del Se propuesto por Bottino y colaboradores, se basa en las analogías del metabolismo de este elemento en plantas superiores y en las microalgas, sugiriendo además de que el Se es metabolizado por la vía de asimilación de azufre (Bottino et al., 1984). Los mecanismos del selenito y selenato difieren, explicando los diferentes niveles de toxicidad de estos iones en la microalga.

El selenato puede ser incorporado al alga mediante los transportadores de sulfato del alga dada su similitud química con este anión, lo cual hace que las enzimas involucradas en el metabolismo de sulfato y en la vía de transulfuración no discriminen entre compuestos de Se y de S (Birringer et al. 2012). La acumulación es directamente proporcional a la concentración de selenato en el medio e indirectamente proporcional a la concentración de sulfato en el medio (Arai & Shiraiwa, 2009). Una prueba adicional de las analogías entre el metabolismo de Se y S lo constituye la presencia de compuestos orgánicos de bajo peso molecular de Se, en plantas, levaduras, bacterias o animales análogos a los compuestos de S. Por otro lado, el transporte de selenito en células de *C. reinhardtii* se realiza mediante dos sistemas de transporte diferentes, dependiendo de la concentración del elemento en el medio (Morlon et al., 2006).

El metabolismo del Se en la forma selenato se presenta esquemáticamente en la figura 15. Una vez absorbido a través de la vía de transportadores de sulfato es metabolizado por las enzimas de la

asimilación de sulfato presentes en los cloroplastos. El primer paso en la reducción de selenato es su activación por la enzima sulfurilasa del trifosfato de adenosina a fosfoselenato de adenosina, el cual es reducido aún más a seleniuro por sulfito reductasa. Una vez que se ha formado el seleniuro, éste se metaboliza a SeCys. Este selenoaminoácido se forma por la acción de la Cys sintetasa, la cual acopla el seleniuro con la O-acetilserina. A continuación, la SeCys se transforma en Se-cistationina y Se-homocisteína y, finalmente se transforma en SeMet.

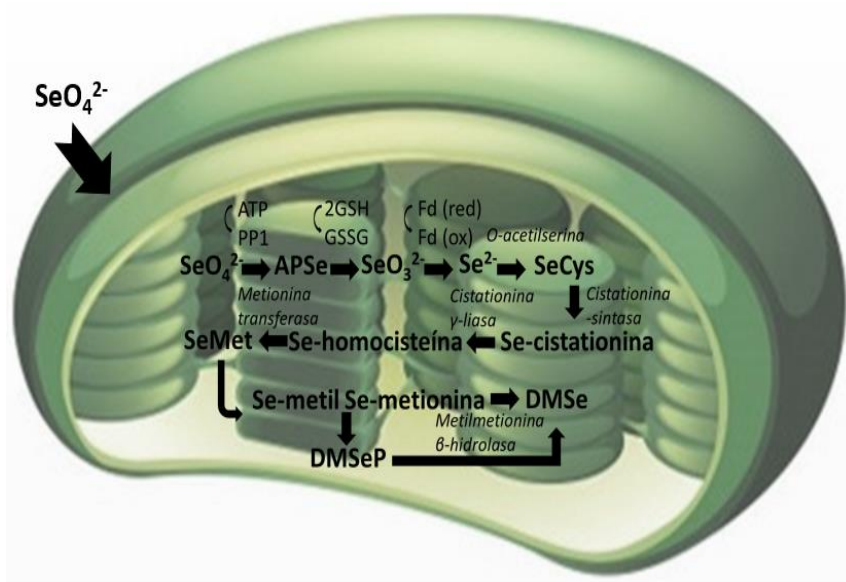


Figura 15. Representación esquemática del metabolismo del selenio en plantas superiores y microalgas.

La incorporación de la SeCys y de la SeMet en las proteínas se lleva a cabo en lugar de la incorporación de la Cys y la Met, respectivamente. La SeMet puede ser metilada y formar SeMeSeCys (Sors *et al.*, 2005) por la acción de metiltransferasa, la cual se transforma en el compuesto volátil DMSe (Neumann *et al.*, 2003), mediante la enzima hidrolasa metilMet o a través del compuesto intermedio propionato de dimetilselenonio (DMSeP).

Cuando se llevaron a cabo ensayos de exposición a Se con microalgas como *Dunaliella primolecta*, *Porphyridium cruetum* y *Chlorella sp* (Bottino *et al.*, 1984), confirmaron que el Se se encuentra principalmente en diferentes compartimientos celulares como

proteínas, aminoácidos (*Dunaliella primolecta* y *Chlorella* sp) o bien como lípidos y carbohidratos solubles (*Dunaliella primolecta* y *Chlorella* sp). En *C. sorokiniana* se han identificado tres selenoaminoácidos mayoritarios: SeCys, SeMeSeCys además de selenocistina (SeCys₂) y SeMet (Stadtman, 1980). Por otra parte cuando se expone la *Chlorella* a selenato, se absorbe rápidamente en pocos minutos en la superficie celular, donde se produce una fijación irreversible del 40% del Se total asimilado por las células, el resto se acumula en el interior en forma orgánica, y de éste más de un 70% del Se se une a las proteínas en forma de SeMet.

Las condiciones de cultivo pueden conducir a la acumulación de SeMet, o por el contrario SeCys que incrementa la incorporación de Se a las proteínas y por tanto al enriquecimiento en la biomasa, en una forma asimilable. Se ha comprobado que en condiciones deficientes de S, la microalga *Chlorella sorokiniana* expuesta a selenato, mejora la acumulación de SeMet. Debido a la capacidad de la *Chlorella* para asimilar Se inorgánico y metabolizarlo produciendo especies orgánicas de este elemento, se han realizado multitud de experiencias estudiando las posibilidades de este proceso en diversos campos.

IV. Especiación química, metalómica y metabolómica

Durante la última década, las tecnologías de análisis masivo “ómicas” han generado información muy valiosa y métodos que han permitido una descripción exhaustiva de casi todos los componentes celulares. La disciplina más conocida quizás sea la genómica, por los significativos avances obtenidos por la obtención de las secuencias completas del genoma de muchos organismos entre ellos el hombre. De esta forma se ha obtenido la información contenida en el núcleo celular, la cual determina el funcionamiento, la evolución y el origen de los genomas. Por otra parte, la transcriptómica examina la expresión genética y la proteómica genera información sobre localización, estructura y función de las proteínas, así como el mecanismo de síntesis y la señalización celular.

Asimismo, hay que considerar que aproximadamente un tercio de las proteínas necesitan la presencia de un metal como cofactor activo (Lobinski et al., 2010; Tainer et al., 1991; Bettmer et al., 2009) y que los metales influyen en más del 50% de las proteínas (Mounicou et al.,

2009). Estos metales son responsables de las propiedades catalíticas de las proteínas o de su estructura, y su presencia en estas biomoléculas está generalmente determinada por el genoma (Tainer et al., 1991). El metaloma, fue definido por Williams como la distribución de elementos, concentración en el equilibrio de iones metálicos libres o elementos libres en un compartimiento celular, célula u organismo (Williams, 2001) y se relaciona con la identidad y/o cantidad de metales/metaloides y sus especies (Lobinski et al., 2010; Szpunar, 2004; Koppelaar & Hieftje, 2007; Mounicou et al., 2009). Por tanto, la metalómica considera que la identificación de un metal como cofactor en una proteína puede ser crucial para asignar su función y situarla en el contexto de una ruta metabólica celular determinada (González-Fernández et al., 2008; Gómez-Ariza et al., 2005). La metalómica se define como el análisis de la totalidad de especies metálicas y metaloides que se encuentran dentro de un organismo, tipo celular o tejido (Szpunar, 2004; Mounicou et al., 2009; Sanz-Medel, 2008; Gómez-Ariza et al., 2004; Szpunar et al., 2003; Sanz-Medel, 2005; González-Fernández et al., 2008). Por su parte la metaloproteómica considera la exploración de la función de los metales asociados a proteínas (Szpunar, 2000; Szpunar, 2005; Bertini & Cavallaro, 2008). A pesar de los aportes de estas estrategias para la química inorgánica y bioinorgánica, resulta difícil establecer hipótesis relacionadas con el funcionamiento celular debido a la complejidad de los sistemas biológicos. No obstante, ninguna de las dos disciplinas descritas relaciona las metaloproteínas, el contenido de metales y sus variaciones en la célula, con el metabolismo. Esta aproximación metodológica es propia de la metabolómica, que considera el análisis de moléculas pequeñas o metabolitos relacionados con el funcionamiento de los organismos, teniendo en cuenta sus concentraciones y las variaciones que experimentan como consecuencia de cambios fisiológicos y genéticos (Fiehn et al., 2000).

Dentro de este campo, Nicholson define la metabonomía como la medida cuantitativa de la respuesta metabólica dinámica multiparamétrica de los sistemas vivos frente a estímulos patológicos o modificaciones genéticas (Nicholson et al., 1999). Recientemente se ha estimado que el número total de metabolitos en plantas y células humanas varía entre 3000 y 8000 (Human Metabolome Database) (Kind et al., 2009), aunque actualmente solo es posible medir una parte de ellos.

Por tanto, mientras que la metabolómica proporciona un medio para conocer la variación de metabolitos de baja masa molecular en

organismos complejos pluricelulares y su respuesta frente a un cambio, las demás tecnologías masivas están relacionadas con el estudio de macromoléculas. En este punto, es posible afirmar que la metabolómica integra también los conocimientos de proteómica, metalómica y metaloproteómica.

De esta forma, el estudio completo de una célula, tejido u organismo precisa tanto del análisis de moléculas de masa molecular elevada como la de baja, ya que estas últimas representan el mecanismo final de acción de los seres vivos. Aunque las estrategias más comunes en un análisis metabolómico son la metabonomía y la metabolómica, existen otros procedimientos importantes (*Dunn & Ellis, 2005; Kaderbhai et al., 2003; Ogra & Anan, 2012*): (i) Perfil metabólico “*metabolite profiling*”, la identificación y cuantificación de un grupo de metabolitos relacionados con una determinada ruta metabólica (por ejemplo, Vitamina hidro- o liposolubles), (ii) huella metabólica (*metabolic fingerprinting*), análisis rápido, global de las muestras permitiendo su clasificación, en función de los metabolitos presentes, habitualmente sin cuantificación ni identificación, (iii) análisis de uno o varios metabolitos críticos en un proceso metabólico concreto (*metabolite target analysis*), (iv) exometabolómica (*metabolite footprinting, exometabolomics*), estudio de metabolitos en fluidos extracelulares, (v) toxicometabolómica, aplicación de la metabolómica a la toxicología (ej. estudio metabolómico de organismos modelo expuestos a xenobióticos), (vi) metalometabolómica, estudio de metabolitos que presentan un metal o metaloide en su estructura (*Ge et al., 2011*) (ej. Selenometabolómica).

En este sentido, la IUPAC define especie química como formas específicas de un elemento definido por su composición isotópica, electrónica o estado de oxidación y/o complejo o estructura molecular, siendo por ello muy fina la línea que separa la metalómica de la metalometabolómica, y esta de la especiación química (*Templeton et al., 2000*).

Es por ello, que puede decirse que estas ómicas se encuentran interconectadas y puede hablarse de una cascada de información que fluye desde la genómica y transcriptómica, a la proteómica y metabolómica. Incluyendo también a la metalómica (Figura 16).

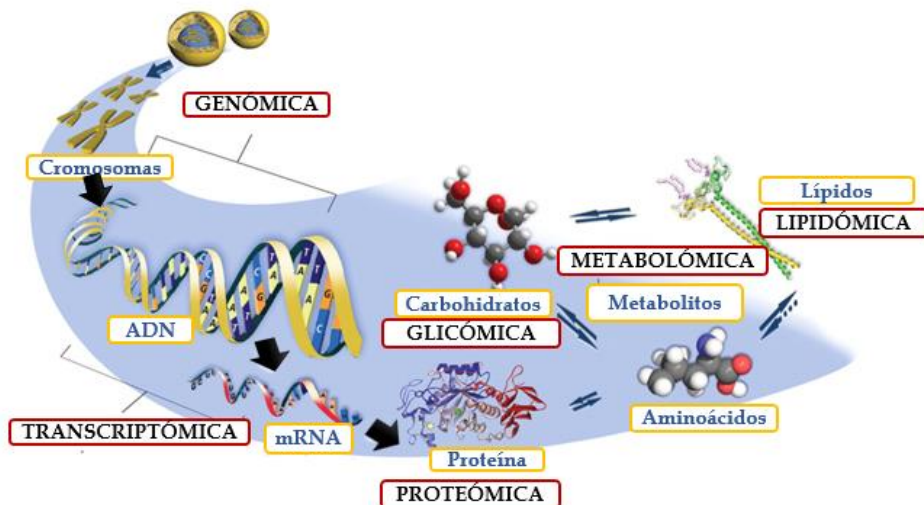


Figura 16. Esquema simplificado de un sistema biológico y las -ómicas que nos aportan información acerca del mismo (Lobinski et al., 2010).

IV.1. Características del análisis de especiación química y metalómico

La forma química en que se encuentre un contaminante determina su toxicidad, movilidad en el medio ambiente y biodisponibilidad.

Los procedimientos convencionales de especiación química, desarrollados durante los últimos veinte años están en la actualidad bien establecidos y pueden utilizarse de forma rutinaria en relación con temas medioambientales, la salud o los alimentos, entre otros. Entre las especies químicas de interés pueden citarse los elementos con diferentes estados de oxidación o compuestos organometálicos de baja masa molecular y de origen antropogénico, en los que el metal o metaloide se encuentra unido covalentemente a la molécula, existiendo en la mayoría de los casos patrones comerciales o que se pueden obtener fácilmente mediante síntesis (por ejemplo, arsenobetaina (AsB), selenito, MeHg, SeMet, etc.).

La especiación de los elementos traza, y en particular de aquellos que no son esenciales, puede considerarse en la actualidad

uno de los principales temas de interés en relación con las metodologías de especiación para la industria alimentaria y las autoridades responsables de la seguridad alimentaria. Entre los elementos más estudiados en este campo por su toxicidad pueden citarse, el As, el Cr y el Hg.

Por otra parte, los iones o especies químicas metálicas, endógenas o exógenas, presentes en los sistemas biológicos presentan una perspectiva diferente ya que integran de forma conjunta moléculas pequeñas como oxalato, citrato, tartrato, aminoácidos u oligopéptidos unidos a metales o metaloides, junto a moléculas de elevada masa molecular como proteínas, fragmentos de ADN o polisacáridos. Este enfoque más global de las especies químicas es más propio de los estudios metalómicos, en los que la complejidad de las especies a considerar, especialmente la falta de información inicial sobre su estructura, unido a la habitual ausencia de estándares moleculares, incrementa estos estudios notablemente. En la figura 17 se muestra una representación esquemática de las especies de interés en Química Analítica Bioinorgánica, que engloban todas las biomoléculas endógenas que contienen un heteroátomo covalentemente unido, así como complejos de elementos traza y sus compuestos.

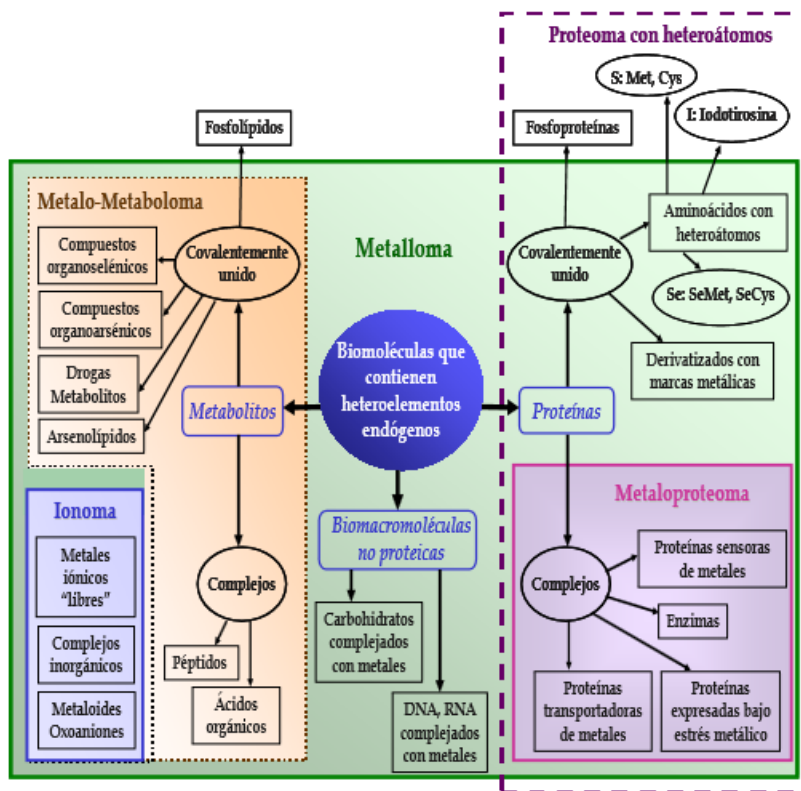


Figura 17. Representación esquemática de las biomoléculas que contienen un heteroelemento endógeno (Lobinski et al., 2006).

Estas moléculas llevan asociadas, normalmente, una función biológica relacionada con el metal o heteroelemento, lo que sitúa a la metalómica al mismo nivel que la proteómica o la genómica. En estos estudios no se disponen de patrones o calibrantes que permitan su identificación y cuantificación. Por ello, los procedimientos metalómicos requieren además el uso de técnicas moleculares complementarias al estudio de los metales integrados en las moléculas, como la espectrometría de masas orgánicas, ya que el uso de ICP-MS como detector elemental destruye cualquier información molecular sobre la naturaleza química de las especies estudiadas (Lobinski et al., 2006; Gómez-Ariza et al., 2004).

Otro problema añadido es la concentración del metal en estudio, ya que numerosos elementos trazas endógenos en sistemas biológicos está por debajo o en el rango sub-ng·g⁻¹, y a su vez distribuido entre varias especies, en las que la contribución del metal al total de la estructura es insignificante en términos de peso. Este hecho, y la

complejidad de la matriz, hacen que los límites de detección constituyan un reto analítico en este campo.

Sin embargo, el principal problema en el análisis de metaloespecies es la identificación mediante espectrometría de masas orgánicas que precisa una gran pureza en la muestra lo que implica una exhaustiva y compleja etapa de purificación. La mayoría de metaloespecies de interés, especialmente aquellas a niveles trazas muy bajos o ultratazas, no están todavía descubiertas. En otros casos, las especies están en librerías, pero la disponibilidad de patrones de calibración es imposible. Algunas veces la baja estabilidad del complejo hace que la tarea analítica sea aún más exigente ya que la preparación de la muestra puede liberar el metal unido a la biomolécula.

La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, ICP-MS, es uno de los detectores más utilizados para el metal, tanto en especiación como en metalómica. En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha empleado esta técnica debido a su versatilidad para la determinación de trazas y ultratazas en materiales biológicos, y a su carácter multielemental y multiisotópico (pudiendo analizarse no metales como S, Se y P) en un amplio rango lineal (6-8 órdenes de magnitud) (Figura 18). La técnica presenta robustez respecto a la matriz analizada. La señal obtenida es independiente de la estructura de la especie, de la matriz en la que se encuentra y del disolvente utilizado en la disolución, siendo directamente proporcional a la masa del elemento (*Taylor, 2001; Thomas, 2004*). Además proporciona un alto rendimiento en el análisis, llegando a usar pequeñas cantidades de muestra (microlitro o sub-microlitro) en análisis en continuo o en modo inyección en flujo usando micro- o nanonebulizadores (*Schaumlöffel et al., 2003; Giusti et al., 2006*).

Uno de los problemas de ICP-MS es la presencia de interferencias espectrales, aunque el uso de una celda de colisión/reacción y el dispositivo de sector magnético permiten eliminar gran parte de las interferencias espectrales, posibilitando la medida de elementos como P y S y mejorando las medidas de las relaciones isotópicas de elementos esenciales tales como Se, Cr, V y Fe.

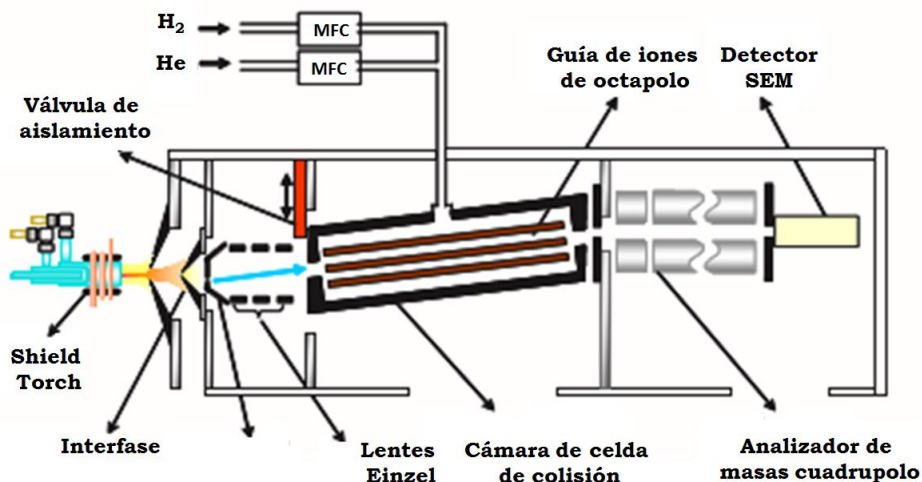


Figura 18. Representación esquemática del equipo ICP-MS Agilent 7500ce.

V. Metodologías analíticas en metalómica

Existen tres estrategias fundamentales para el desarrollo y aplicación de técnicas metalómicas y metaloproteómicas. Una es el uso de los acoplamientos tradicionales utilizados en especiación combinándolos con el uso en paralelo de técnicas de identificación de moléculas, en particular el empleo del ICP-MS como detector atómico y un espectrómetro de masas con fuente de ionización por electrospray (ESI) o de ionización-desorción láser asistida por matriz (MALDI), como detector molecular. El desarrollo reciente de los espectrómetros de masas de alta resolución tales como los sistemas híbridos cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) (*Fiehn et al., 2000*), cuadrupolo-trampa iónica (Q-IT), triple cuadrupolo tiempo de vuelo (QqQ-TOF) o el Orbitrap (OT) (*Mounicou et al., 2009*) permiten una identificación inequívoca de biomoléculas (*Bettmer et al., 2009*), lo que representa una herramienta idónea para el conocimiento de todas las especies formadas en el metabolismo celular. Estos procedimientos analíticos multidimensionales (MAA) que combinan dos sistemas de detección complementarios, atómico y molecular, aportan resultados que permiten la caracterización estructural y funcional de las metaloproteínas (*Bettmer, 2005; Sanz Medel et al., 2003*).

Mediante la aplicación de técnicas de separación se consigue reducir el problema de la complejidad molecular existente en las

muestras biológicas y la presencia de múltiples especies de un mismo elemento. Esta aproximación instrumental combina el acoplamiento de la unidad de separación de especies con el ICP-MS y/o la espectrometría de masas molecular para la determinación estructural. Un punto importante a considerar es la posible transformación de especies y alteración del enlace metal-biomoléculas durante los tratamientos de muestra involucrados.

Tal y como se refleja en la figura 19, como técnicas separativas, puede emplearse la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), la cromatografía de gases (GC) y las técnicas electroforéticas para la separación de aductos metal-biomolécula. Entre las técnicas electroforéticas pueden citarse la electroforesis monodimensional en gel, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) o el isoelectroenfoque (IEF), o bien la técnica electroforesis bidimensional 2-DE, que emplea ortogonalmente IEF y SDS-PAGE. Por otra parte, la electroforesis capilar (CE) también se ha utilizado en numerosas ocasiones para estudios de metalómica. Todas las técnicas de separación antes comentadas pueden acoplarse a ICP-MS, ya sea “*on-line*”, en el caso de LC o CE, u “*off-line*”, para SDS-PAGE, empleando una célula de ablación láser (LA-ICP-MS). El uso de un detector elemental de alta sensibilidad y selectividad, como el ICP-MS, permite monitorizar el metal en estudio, tras el proceso de separación de sus especies, e incluso su cuantificación.

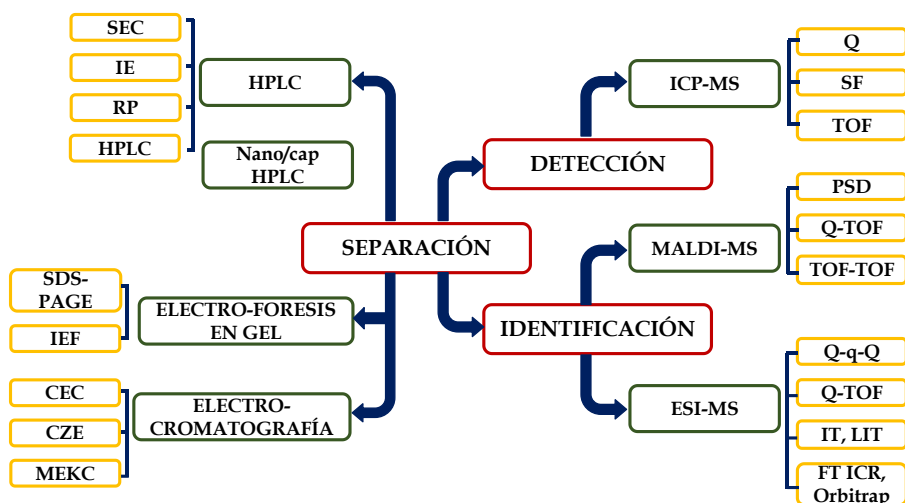


Figura 19. Representación esquemática de las técnicas híbridas utilizadas para la especiación de metales traza en los fluidos biológicos.

Entre las ventajas que presenta el ICP-MS en relación a su uso en metalómica podemos destacar: i) El desarrollo de interfaces que permiten la introducción de los efluentes de columnas capilares (d_i 300 μm) y nanocapilares ($d_i < 150 \mu\text{m}$) mediante inyección directa o nebulización, llegándose a unos límites de detección del orden de femtogramos en condiciones de plasma seco. ii) Escaneo de geles 2D para el análisis que contienen metales mediante ablación láser ICP-MS, ofreciendo una alternativa más económica a otras técnicas utilizadas para el mismo propósito, como fluorescencia de rayos X (XRF). Por otro lado, podemos citar como inconveniente de ICP-MS su incapacidad para caracterizar las estructuras de metabiomoléculas, siendo imprescindible el uso de espectrometría de masas molecular para este propósito.

Dado que cualquier extracción del analito de su medio original supone un riesgo de alteración de su identidad, una buena alternativa consiste en aplicar técnicas que posibiliten la determinación directa en la muestra o con el menor grado de preparación.

La determinación directa podría abordarse en una muestra sólida sencilla mediante espectrometría de absorción de rayos X (XAS), que proporciona información acerca del estado de oxidación y de la coordinación del metal. Sin embargo, su baja sensibilidad y el requerimiento de una gran pureza en la composición de la muestra hacen que sus aplicaciones sean limitadas. Además, la identificación está supeditada a la comparación de espectros de la muestra con los de compuestos de referencia.

Así mismo pueden usarse diversas técnicas para el análisis en disolución de extractos de muestras, como la resonancia magnética nuclear (RMN), ESI- o MALDI-MS o incluso la espectroscopia óptica (ultravioleta-visible (UV-VIS), infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), raman, fluorescencia, dicroísmo circular) (*Lobinski et al., 2006*). Sin embargo, la aplicación directa de estas técnicas lleva intrínseca una falta de sensibilidad y selectividad, que impide el estudio efectivo en la mayoría de los casos que suele plantear el estudio de muestras complejas.

V.1. Espectrometría de masas molecular para la determinación estructural de los complejos metal-biomoléculas

Las técnicas de ionización aplicables a espectrometría de masas más utilizadas para la elucidación estructural de metal-biomoléculas son MALDI (*Chassaigne et al., 2000*) y ESI (*Encinar et al., 2003*). Sin embargo, en determinados casos podrían también usarse las técnicas clásicas de RMN o difracción de rayos X. Sin embargo, el acoplamiento LC-MS o CE-MS empleando ESI como interfase está muy desarrollado y la MS proporciona información más extensa y fácil de interpretar, por lo que ésta suele ser la técnica de elucidación estructural más utilizada para caracterizar metalobiocompuestos. El uso de MALDI-MS es menos frecuente debido a su menor capacidad para estudiar el enlace metal-biomolécula y su aplicación “*off-line*” tras la técnica de separación. Por otro lado, la sensibilidad y especificidad de ICP-MS, además de su capacidad cuantitativa, inigualables por ESI-MS o MALDI-MS, hace que el uso de la primera nunca pueda ser totalmente sustituido por la MS en un estudio completo en metalómica, que puede beneficiarse de la combinación de ambas herramientas analíticas. Dada la importancia de este hecho, recientemente se ha desarrollado un espectrómetro de masas con analizador TOF con una fuente dual ICP y ESI, permitiendo el acoplamiento simultáneo a ambos tipos de ionización, y por tanto, la obtención de la información elemental y molecular en un mismo análisis (*Rogers et al., 2009*).

La ESI se utiliza en sistemas de detección para el análisis de proteínas *on-line* dentro de un rango de masas 500-3000 m/z, las cuales ha sido previamente separadas por CE o LC, o incluso para masas superiores a 3000 Da (*Rosenberg, 2003*). Mediante ESI son abundantes los iones de carga múltiple del tipo $[M+nH]^{n+}$ y $[M+nH]^n$ y suelen detectarse series de iones moleculares que difieren en una unidad de carga. Al operar a presión atmosférica y a temperaturas no demasiado altas, la ionización es extremadamente suave, consiguiendo iones cuasi-moleculares intactos, evitando la rotura de enlaces covalentes (Figura 20). Esto lo convierte en un método de ionización muy apropiado para el análisis de proteínas, ya que permite la conversación intacta de los enlaces covalentes, aunque puede afectar a los no covalentes, provocando la disociación en los correspondientes polipéptidos. Sin embargo, la eficiencia en el proceso de ionización es dependiente del compuesto y puede variar en función de la matriz.

Aunque ESI puede llevar asociados analizadores de masas tan sencillos como un Q o un TOF, también es frecuente el empleo de trampa de iones (IT).

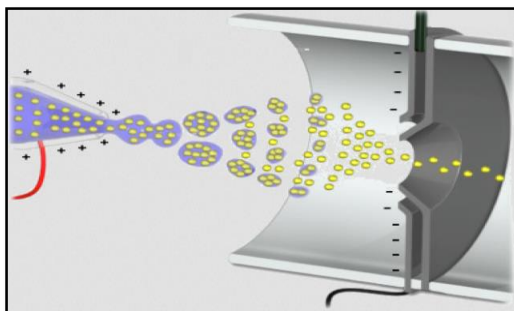


Figura 20. Representación del funcionamiento de una fuente de ionización ESI.

Una versión miniaturizada de ESI es la fuente nano-electrospray (nanoESI o nESI), que permite trabajar con caudales de $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ o para analitos que se encuentren en concentración muy baja. La diferencia entre las dos fuentes reside en el diámetro interno del capilar. El spray se consigue empleando voltajes considerablemente más bajo (500-800 V) y no requiere un bombeo externo, ya que la disolución emerge a $10\text{-}20 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ del capilar por sí misma, produciendo gotas especialmente pequeñas. Tampoco requiere gas de secado. El capilar suele situarse a 1-2 mm del orificio de la fuente, por lo que se mejora la eficiencia de ionización, desolvación y transferencia.

Como analizador de masas se recomienda el uso de TOF-MS ya que se consigue una exactitud $5\text{-}10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ en la medida de la masa molecular (M_r) lo que permite la determinación de la fórmula empírica de metaloespecies con el $M_r < 500$. La información estructural puede ser adquirida por la disociación inducida por colisión (CID) de un ion seleccionado por un filtro de masa cuadrupolar seguido de la medida del ion producto mediante un analizador de masas cuadrupolar o un TOF. Para completar la caracterización de las metalomoléculas suele ser necesario el uso de otros procedimientos analíticos, como la acidificación post-columna para disociar los complejos formados por bioligandos, o la digestión enzimática antes de la secuenciación de aminoácidos mediante espectrometría de masas en tándem como ESI-MS/MS. Tras la adquisición de los datos, éstos son comparados con las bases de datos de secuenciación en modo automático o interpretados manualmente.

El inconveniente del uso de ESI-MS es la influencia en la señal de los iones concomitantes generados por los componentes de la matriz, los cuales suprimen la ionización de las especies de interés. Por lo tanto, es necesaria la purificación previa de las especies por cromatografía líquida multidimensional antes de ser introducidas en la fuente de iones con el fin de evitar la llegada simultánea del ion del analito y los iones más abundantes de otras especies.

La fuente de ionización MALDI es un método de ionización suave basado en el empleo de una matriz en la que se dispersa la muestra a analizar para facilitar la ionización indirecta de los analitos. Esta matriz, que debe absorber fuertemente a la longitud de onda del láser empleado, se co-cristaliza con la muestra y se irradia con el láser pulsante. Tras la irradiación, las moléculas de matriz absorben energía y pasan al estado gaseoso, arrastrando con ellas a las moléculas de analito. En este proceso, se desorben y vaporizan moléculas neutras, iones positivos y negativos de matriz y moléculas neutras de analito. La ionización de las moléculas de analito transcurre en fase gaseosa, donde se produce la transferencia de carga entre matriz y analito. En el proceso se generan iones principalmente de carga +1, con nulo o escaso grado de fragmentación de los analitos (menos que con ESI), siendo también menos sensible a los efectos de matriz que ESI. Los iones producidos son entonces extraídos de la fuente de ionización y, aplicando un potencial de extracción, son conducidos al espectrómetro de masas (Figura 21). A diferencia de la ESI, MALDI presenta una elevada tolerancia a los contenidos de sales y otras interferencias.

La fuente MALDI suele asociarse a un analizador de tiempo de vuelo (TOF) en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico, o a un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másica. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Posteriormente se selecciona un determinado ion y sus iones fragmentos, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF. La fuente MALDI es más tolerante que la fuente ESI para una mayor masa de muestra y frente a contenidos mayores de sales, tampones y otras sustancias.

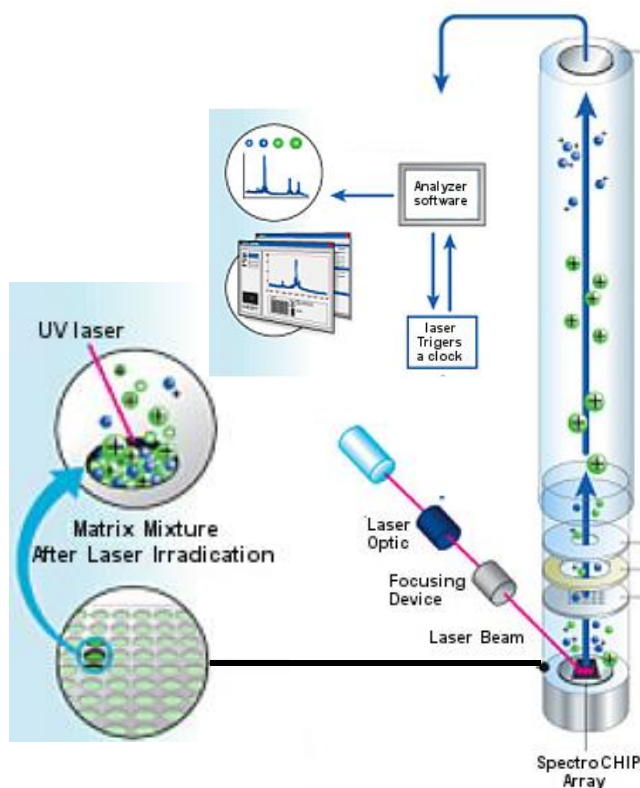


Figura 21. Esquema del funcionamiento del dispositivo MALDI-TOF-MS.

V.2. Separación cromatográfica en análisis metalómicos

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. Los mecanismos de separación más utilizados en HPLC son:

Cromatografía de exclusión molecular (SEC): Propuesta en numerosos estudios. El acoplamiento SEC-ICP-MS permite realizar un rápido “screening” cualitativo de metalobiomoléculas en muestras biológicas de acuerdo a su masa molecular (Szpunar J., 2000; Szpunar, 2005, Makarov & Szpunar, 1998). El acoplamiento es muy sencillo y permite el fraccionamiento en condiciones nativas de

metalobiomoléculas en función de su tamaño, seguido de la detección multielemental, lo que permite monitorizar tanto diversos metales como otros heteroátomos que puedan estar presentes, como P (en el caso de fosfoproteínas, o nucleótidos) o S en las proteínas. Debido a su baja resolución, SEC tan sólo puede considerarse una técnica preparativa en separaciones multidimensionales (*Chan & Caruso, 2012; Aureli et al., 2012*). Por lo tanto, después de la separación SEC generalmente se aplican otras técnicas cromatográficas que utilizan mecanismos de separación diferentes, para poder llevar a cabo la purificación de las metalobiomoléculas, pudiéndose asociar de manera inequívoca un elemento traza en particular con una biomolécula en una fracción dada. Por otro lado, es necesario controlar la recuperación de las especies de la columna para evitar que posibles iones metálicos retenidos en la fase estacionaria puedan intercambiarse con los de otros complejos metálicos o que sean acomplejados por otros bioligandos.

Cromatografía de intercambio aniónico (AEC): Permite la separación de las especies aniónicas presentando mayor poder de resolución que la SEC y capacidades preconcentradoras. Las disoluciones empleadas en SEC o AEC son compatibles con el acoplamiento en línea del ICP-MS, cuando se empleen concentraciones salinas reducidas (ya que el empleo de sales puede provocar problemas de obturación de los conos y del nebulizador y un descenso de la señal) o sales volátiles.

Cromatografía de fase reversa (RPC): La adición de agentes formadores de pares iónicos a la fase móvil amplía las aplicaciones de esta técnica cromatográfica, ya que permite la separación de moléculas neutras, aniónicas y catiónicas (*Nurmi et al., 2005*). La cromatografía de fase reversa, 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.

Cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC): Presenta particular interés para el estudio de metalometabolitos por su carácter polar y baja hidrofobicidad. Las fases estacionarias están constituidas por grupos polares o hidrofílicos y las fases móviles utilizadas incluyen medios acuosos y orgánicos. Mediante el uso de HILIC se abordó el análisis del selenometaboloma en levadura (*Dernovics & Lobinksi, 2008*) o de complejos metálicos con moléculas orgánicas como fitosideróforos divalentes o ácidos orgánicos (*Ouerdane et al., 2006*).

El empleo de fases móviles orgánicas en RPC o HILIC provoca una disminución en la señal al ser introducidas en ICP-MS y una inestabilidad en el plasma. Por tanto, para su acoplamiento a ICP-MS

se suele adicionar oxígeno al gas del plasma para producir la combustión de los disolventes orgánicos, y evitar los depósitos de carbón. Además suelen utilizarse conos de Pt, ya que los habituales de Ni se atacan rápidamente.

Por otro lado, a diferencia de las otras modalidades de HPLC, el tipo de fases móviles empleadas en RPC o HILIC (disolventes orgánicos como acetonitrilo o metanol y fases acuosas con tampones volátiles) hacen estas técnicas muy compatibles para su acoplamiento a ESI-MS, y tanto capHPLC como nanoHPLC pueden acoplarse de forma sencilla con interfases comerciales. Por ejemplo, en el caso de nanoHPLC, basta con conectar a la salida de la columna un capilar metálico, al que se aplicará una diferencia de potencial. En consecuencia, estas técnicas son adecuadas para llevar a cabo el acoplamiento en paralelo HPLC-ICP-MS y HPLC-ESI-MS/MS utilizado en numerosos estudios en metalómica, generalmente como dimensión separativa final tras previas separaciones de las metaloespecies (*Polec et al., 2000; Dernovics et al., 2007; Giusti et al., 2006*). De esta forma, conociendo los tiempos de retención para las especies metálicas, determinados por HPLC-ICP-MS se facilita el hallazgo de metaloespecies por HPLC-ESI-MS/MS, también en base a su perfil isotópico. Además, la posibilidad de realizar una preconcentración en línea sencilla y rápida empleando una precolumna de RPC donde se retengan los analitos, seguido de elución contracorriente hacia la nanocolumna cromatográfica donde tiene lugar la separación, supone un aumento de la sensibilidad y prestaciones de la técnica.

Para garantizar la pureza del analito antes de llegar al detector se han usado técnicas de separación en tres dimensiones, como ejemplo puede citarse el acoplamiento SEC-AEC-CEC para el aislamiento de especies de As en algas (*McSheehy et al., 2001*) y ostras (*McSheehy et al., 2001*), así como especies de Se en extractos de levadura selenizada (*McSheehy et al., 2002b*).

V.3. Estudios metalómicos y de especiación química en microalgas y macroalgas

Aunque la bibliografía no es muy extensa en relación a especiación química en microalgas y algas, existen varios trabajos relacionados sobre todo con la especiación de arsénico, yodo y selenio. En cuanto a las técnicas analíticas utilizadas, en general los métodos

cromatográficos han sido los más empleados para llevar a cabo la especiación de metales, siendo el HPLC la técnica más utilizada, aunque en bibliografía también se describen metodologías basadas en el uso del GC y la CE.

Para la determinación de especies de As, la cromatografía de intercambio iónico (IE) ha sido el modo cromatográfico más empleado en HPLC, debido a la naturaleza iónica de las principales especies de este elemento, especialmente las más tóxicas, y a su menor sensibilidad a las interferencias por efecto de la matriz, al utilizarse fases móviles con elevada capacidad tamponadora. Las especies de As presentan características iónicas muy variables y dependientes del pH, de forma que pueden ser catiónicas, aniónicas o neutras (*Leermakers et al., 2006*). A pH neutro, las especies de As(V), metilarsónico (MMA) y dimetilarsínico (DMA) se encuentran como aniones; arsenocolina (AsC), óxido de trimetilarsina (TMAO) e ión tetrametilarsonio (TETRA) como cationes; AsB como zwitterión; y As(III) como especie neutra (*Sharma & Sohn, 2009*). Como resultado, las especies As(III), As(V), DMA y MMA suelen separarse mediante AEC, junto con los arsenoazúcares (*Raber et al., 2000*), aunque es necesario tener en cuenta que el As(III) suele eluir en las proximidades del tiempo muerto, por lo que puede solapar con especies neutras o catiónicas no retenidas (*Gómez-Ariza et al., 2001*). Por otro lado, las especies AsB, AsC, TMAO y TETRA se suelen separar mediante intercambio catiónico.

La cromatografía de formación de pares iónicos se ha aplicado para la determinación de especies de As, incluyendo As(III), As(V), MMA, DMA, AsB, AsC, TMAO y TETRA en muestras de algas (*Wrobel et al., 2002; Simon et al., 2004b; Hirata & Toshimitsu, 2005; Hirata et al., 2006; Hamano-Nagaoka et al., 2008; Narukawa et al., 2012*). La cromatografía SEC-HPLC se ha empleado como método de cromatografía preparativo para la purificación de extractos de algas (*McSheehy & Szpunar, 2000; McSheehy et al., 2001; 2002b*). Asimismo, se ha empleado en combinación con otros modos cromatográficos de forma secuencial, dando lugar a la cromatografía líquida multidimensional. De esta forma, se ha utilizado junto con la cromatografía de IE y/o de fase inversa para la determinación de especies de As en muestras de algas (*McSheehy & Szpunar, 2000; McSheehy et al., 2001; 2002b*).

Recientemente, *García-Satal et al., (2012)* han desarrollado un método basado en HPLC bidimensional, consistente en la separación de compuestos de As (As(III), As(V), MMA, DMA, AsB y arsenoazúcares)

mediante cromatografía SEC, seguida por AEC, para estudiar la biodisponibilidad *in vitro* de las especies de As presentes en muestras de algas comestibles.

Los sistemas de detección más comúnmente empleados en su acoplamiento a sistemas cromatográficos corresponden a detectores atómicos, ya sean de absorción (AAS), emisión (AES), fluorescencia o ICP-MS (*Francesconi & Kuehnelt, 2004; Harrington et al., 2010*). Asimismo, el sistema ESI-MS permite confirmar la identidad de las especies de As, así como obtener información estructural de nuevos compuestos arsenicales desconocidos.

El acoplamiento HPLC-AAS requiere sistemas de generación de hidruros como interfase (HPLC-HG-AAS), con objeto de alcanzar los límites de detección necesarios para llevar a cabo la determinación de especies de As en muestras biológicas y medioambientales (*Butcher, 2007; Anawar, 2012*). El acoplamiento HPLC-ICP-MS se ha aplicado a la determinación de especies de As en algas (*McSheehy et al., 2000, 2001; Madsen et al., 2000; Raber et al., 2000; Geiszinger et al., 2001; Tukai et al., 2002; Kohlmeyer et al., 2003; Wei et al., 2003; Sloth et al., 2005; Thomson et al., 2007*). La sensibilidad del acoplamiento HPLC-ICP-MS, puede verse incrementada mediante la introducción de muestra por generación de hidruros. De esta forma, este acoplamiento (HPLC-HG-ICP-MS) se ha empleado para llevar a cabo estudios de especiación de As en algas (*Schmeisser et al., 2004*).

Debido a la naturaleza volátil de algunas especies de yodo, el GC-MS se ha utilizado frecuentemente, aunque para analizar los compuestos no volátiles de este elemento es necesario incluir una etapa de derivatización. Los compuestos carbonados de yodo como metil-yoduro, etil-yoduro y cloro-yodo-metano pueden ser determinados en algas mediante GC con detector de captura de electrones (ECD) (*McConnell & Fenical, 1977*). El GC-ECD/MS también se ha utilizado para compuestos volátiles de yodo en algas. En el caso de la *Asparagopsis* se extrajeron con pentano y se analizaron mediante GC-ECD, y los menos volátiles por GC-MS (*McConnell & Fenical, 1977*). Sin embargo, debido a la naturaleza de las especies de yodo, el HPLC suele ser la técnica más empleada en especiación de este elemento, utilizando el ICP-MS como el sistema de detección. La primera aplicación de la SEC para el análisis de biomoléculas unidas a yodo, fue propuesto por Makarov y Spuznar para la determinación de yodo unido a proteínas de suero (*Makarov & Spuznar, 1998*). A partir de entonces, la SEC ha sido utilizada para la determinación de yodo unido a proteínas en

diferentes matrices, como en muestras de algas y microalgas (*Shah et al., 2005; Grant et al., 2004*), yodo unido a polifenoles (*Hou et al., 2000*) y también para determinados compuestos de yodo de baja masa molecular. Para la separación de las especies inorgánicas de yodo se ha utilizado la AEC en microalgas y algas (*Gómez-Jacinto et al., 2010*) mientras que las orgánicas (MIT, DIT, yodo inorgánico) se han separado mediante RPC en algas *Wakame* y *Kombu* (*Shah et al., 2005*).

Para la especiación de Se en algas y microalgas, se han propuesto varios procedimientos analíticos, habitualmente combinando una técnica de separación de especies de Se y un método sensible a la detección del analito. La técnica utilizada con más frecuencia para estudios de especiación de Se es hoy la cromatografía o separación mediante electroforesis acopladas al ICP-MS (*Lobinski et al., 2000; Pyrzyńska, 2001*). La adición de gas metano al ICP produce una mejora del límite de detección hasta 0,35 y 0,49 ng·kg⁻¹ para selenito y SeMet, respectivamente (*Wartburton & Geonage-Infante, 2007*). La cromatografía líquida operando en diferentes modos permite llevar a cabo separaciones de las especies de Se no volátiles y tiene generalmente mejor versatilidad que la GC, que puede requerir una derivatización previa al análisis. La identificación de las especies separadas se basa principalmente en la comparación de los tiempos de retención de patrones comerciales y/o mediante el análisis por adición estándar. Sin embargo, no están disponibles todos los patrones de los compuestos de interés de Se. Este problema se resuelve habitualmente mediante la síntesis de las especies que esperamos encontrar en las muestras o mediante purificación del compuesto para su identificación mediante MS (*Encinar et al., 2003*).

VI. Metodologías analíticas para estudios metabolómicos

Los estudios metabolómicos se pueden abordar de dos formas, en los casos en los que se conozca el número y tipo de metabolitos de interés, se puede realizar un enfoque dirigido (*target analysis*), o también conocido como estudio de perfiles (*profiling*), siendo su objetivo la identificación y cuantificación de un determinado grupo de metabolitos preestablecidos. El hecho de conocer de antemano los metabolitos de interés es de gran ayuda a la hora de escoger el mejor método para su detección, ya que desde el principio permite optimizar tanto el método de extracción como la técnica analítica a utilizar para su análisis. Por el contrario, en los casos en los que no se tenga

información previa acerca de los metabolitos que puedan estar implicados en un proceso biológico/bioquímico en concreto, se lleva a cabo mediante enfoque no dirigido (*non-target analysis*) también llamado de huellas dactilares (*fingerprinting*) (Dunn & Ellis, 2005; Kaderbhai et al., 2003; Ogra & Anan, 2012).

El esquema general de trabajo de cualquier estudio metabolómico consta de una serie de etapas comunes. Se inicia con la selección del material biológico (usualmente biofluidos como sangre, orina, células, tejidos) y muestreo. El número de muestras en un estudio metabolómico para el descubrimiento de biomarcadores debe ser suficientemente elevado como para corregir los errores asociados a la variabilidad biológica y obtener así datos estadísticamente válidos. A pesar de que el análisis directo debería ser la opción ideal para muestras sólidas y líquidas, es una opción poco frecuente. Por tanto, la mayoría de los métodos analíticos utilizados requieren un tratamiento de muestra, seleccionado en base al tipo de muestra y analitos a analizar (en caso de *fingerprinting* debe ser lo más simple posible para evitar pérdidas). Una vez preparada la muestra, las disoluciones resultantes se analizarán mediante la técnica analítica adecuada para el objetivo del análisis.

Para el análisis simultáneo de numerosos metabolitos, suele utilizarse RMN (Ogra & Anan, 2012) y la MS (Lobinski et al., 2010). La RMN es la herramienta más empleada, por su robustez, por tratarse de una técnica no destructiva, permitiendo análisis *high-throughput* (*de alto rendimiento*). La MS tiene como puntos fuertes su alta sensibilidad y selectividad. Desde un punto de vista instrumental, los componentes que podemos encontrar en el sistema de análisis serán; el sistema de introducción de muestra, la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector. En el espectrómetro de masa, la muestra se puede introducir directamente (infusión directa, DIMS) (Castrillo et al., 2003; McDougall et al., 2008); pero este sistema presenta algunas desventajas, como la presencia de interferencias isobáricas y los procesos de supresión iónica que se producen durante la ionización, especialmente por la presencia de sales en la matriz; por lo que en muchas ocasiones es conveniente el acoplamiento a técnicas separativas de alta resolución, como GC, LC o CE, previamente al espectrómetro de masas. En la figura 22 se recogen algunas de las técnicas analíticas utilizadas en un estudio metabolómico.

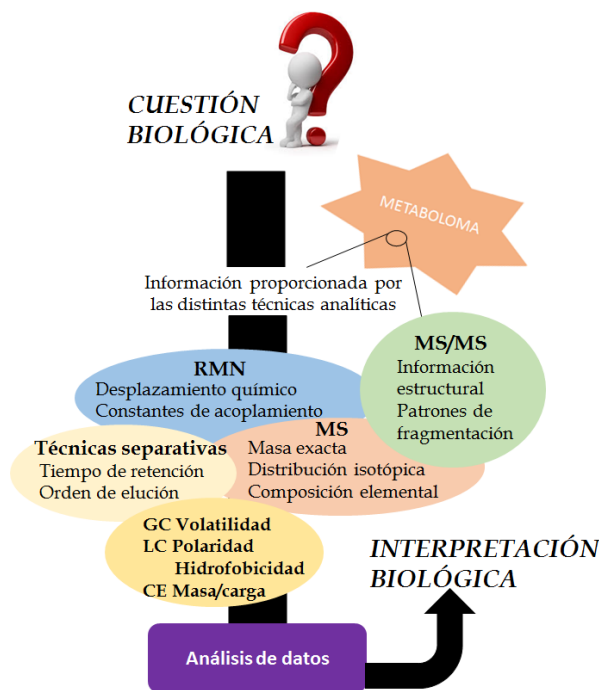


Figura 22. Representación esquemática de las técnicas analíticas utilizadas en un estudio metabolómico.

El resultado que se obtenga de un espectrómetro de masas, depende notablemente de cuáles sean la interfase (o fuente de ionización) y el analizador utilizados. Se han descrito diversas fuentes de ionización (*Gelpi, 2002*), que se suelen clasificar atendiendo al grado de fragmentación que provoquen en la estructura del compuesto a estudiar en técnicas de ionización fuertes, como impacto electrónico, y otras más suaves, entre las que se encuentran ESI, ionización química a presión atmosférica, fotoionización a presión atmosférica, ionización química, bombeo atómico, MALDI, etc. En lo que concierne al analizador de masas, los más empleados en metabolómica son el Q, IT, QqQ, TOF, OT, acoplamientos entre varios de los mencionados, etc.

En esta Tesis, el análisis metabolómico se ha llevado a cabo con un sistema híbrido QqQ-TOF, que proporciona elevada sensibilidad y resolución, lo cual lo hace idóneo para la obtención de perfiles metabolómicos sin necesidad de usar una técnica cromatográfica de separación previamente. Además, este sistema permite la identificación de especies mediante experimentos MS/MS,

en los que el cuadrupolo Q_1 y Q_3 actúan como filtros de masas, Q_2 como celda de colisión y el TOF como analizador de masas.

Una vez realizadas las medidas instrumentales, para poder obtener la información útil sobre el problema que se plantea, se tienen que comparar los datos en busca de diferencias entre condiciones experimentales. La comparación entre conjuntos se puede realizar de modo multivariante (*Swann et al., 2011*) aunque también es posible una aproximación univariante, eligiendo bien tanto el test estadístico que se va a utilizar como la aplicación de técnicas de corrección necesarias en cada situación. Los datos obtenidos en un experimento metabolómico son muy complejos (por el elevado número de muestras y de metabolitos en cada una de ellas), por lo que los datos deben ser preprocesados antes de llevar a cabo la evaluación de los resultados. Para la identificación de metabolitos mediante espectrometría de masas, se comparan los patrones de fragmentación con patrones disponibles en bases de datos, tales como HMDB, Metlin o MassBank entre otras. En el caso de que no se conozca el patrón de fragmentación, se tiene que recurrir a métodos de elucidación estructural para la identificación del metabolito (*Patti et al., 2012*).

VI.1. Estudios metabolómicos de microalgas y macroalgas

Hasta la fecha, los estudios metabolómicos en plantas acuáticas o algas son escasos, aunque su importancia ambiental es equivalente a la de organismos terrestres. Durante muchos años, los análisis de extractos de algas marinas se restringieron a la identificación específica y cuantificación de ciertos compuestos relevantes en el contexto de los usos económicos de estos organismos. Se analizaban principalmente los extractos acuosos que contienen compuestos implicados en el metabolismo del carbono tales como azúcares, nucleóticos, polioles y polisacáridos utilizando técnicas como, GC-MS, HPLC o RMN. También se han realizado otros estudios mediante GC con detector de MS, cuando este sistema estuvo más accesible, sobre todo para determinar esteroides y ácidos grasos libres. Finalmente se han estudiado los perfiles de pigmentos se han analizado también, para describir los diferentes taxones de algas (alga rojas, verdes, *Rhizaria*, *Dinoflagellates*, *Stramenopiles*).

Hay sólo un número limitado de estudios recientes de metabolómica en alga realizados mediante MS. En comparación con

plantas terrestres, el conocimiento de los mecanismos de defensa química de microalgas y/o macroalgas es escaso, lo cual limita el conocimiento de las interacciones mediadas químicamente que tienen lugar entre las algas y otros organismos. Los avances técnicos asociados a la metabolómica, permiten nuevos enfoques para la caracterización de estas interacciones con su medio ambiente.

Bölling y Fiehn desarrollaron el perfil de metabolitos en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* crecida en condiciones de estrés medioambiental mediante GC. Los resultados obtenidos demostraron que, en dichas condiciones de crecimiento, se expresan cientos de compuestos de baja masa molecular, concluyendo que estas condiciones deben ser controladas para evitar cambios metabólicos (Bölling & Fiehn, 2005). En un estudio más reciente en este microorganismo, se examinó la respuesta de ciertos metabolitos mediante GC-MS. Los resultados concluyen que la deficiencia de nitrógeno induce una respuesta de estrés global que resulta en un aumento de ciertos ácidos grasos, ácido cítrico, Met, ácido citramálico, trietanolamina, nicotianamina, trehalosa y sorbitol (Wase et al., 2014).

El metabolismo de lípidos en las algas también se ha evaluado mediante análisis de MS bajo diversas condiciones. En este sentido, se ha concluido que en respuesta a jasmonato de metilo o al patógeno de algas verdes *Acrochaete operculata*, el alga roja *Chondrus crispus* produce derivados de ácidos grasos (Bouarab et al., 2004; Gaquerel et al., 2007), y se ha determinado la presencia de C18 y C20, mediante la combinación de LC-MS y los métodos de GC-MS.

Por otra parte, se ha llevado a cabo la cuantificación de los aminoácidos de micosporina, compuestos implicados en respuestas de estrés en varios tipos de organismos fotosintéticos marinos, en *Palmaria palmata* (Yuan et al., 2009). El análisis de extractos de esta alga mediante ESI-MS, señaló diferencias en el contenido de micosporinas de algas expuestas a radiación UV, sin apreciarse cambios en la capacidad de absorción de radicales de oxígeno. Estas diferencias en los contenidos micosporinas estaban relacionadas con la variabilidad en las actividades antiproliferativas de *Palmaria*.

La ESI-MS indicó también la presencia de metabolitos en extractos de algas, que estaban relacionados con compuestos antifúngicos. Así, se ha detectado un gran número de metabolitos, al menos 300, en la especie *Portieria* mediante GC-MS (Payo et al., 2011).

Los resultados obtenidos mostraron variaciones en metabolitos entre las etapas del ciclo vital de cada especie.

Como se ha comentado previamente, los compuestos halogenados, son frecuentes en macroalgas rojas y pardas, siendo su metabolismo muy interesante, como pone de manifiesto un trabajo reciente (Kundel et al., 2012). La combinación de ICP-MS, TOF o GC-MS ha permitido describir el metabolismo halogenado en seis macroalgas pardas y dos algas rojas. El estudio mostró diferente abundancia de las especies, yodometano y diyodometano, siendo más abundante esta última especie en las algas pardas, y a la inversa en las dos macroalgas rojas (La Barre et al., 2010). La MS de iones secundarios fue utilizada también para el análisis de la distribución de yodo en *Laminaria digitata* (Verhaeghe et al., 2008).

Por otro lado, las algas pardas también son consideradas como reservorios de otros tipos de metabolitos secundarios, entre ellos las isoflavonas, conocidas por presentar propiedades farmacéuticas. Kledjus y colaboradores detectaron hasta ocho compuestos de isoflavonas en cianobacterias y varias especies de algas pardas y rojas (Klejduš et al., 2010) mediante HPLC acoplado a MS y QqQ para la fragmentación de los compuestos.

Durante la última década, se han desarrollado varios métodos para la identificación de marcadores químicos de las respuestas de defensa en macroalgas pardas. De esta forma, se han detectado cambios significativos en la concentración de ácidos grasos y derivados oxigenados en *L. digitata* mediante LC-MS, bajo condiciones de estrés (Ritter et al., 2008; Goulitquer et al., 2009; Gravot et al., 2010; Dittami et al., 2011). Asimismo, en estudios recientes, Tonon y colaboradores describieron diferentes enfoques para la integración de resultados de metabolómica con datos de genómica y transcriptómica para el avance en el conocimiento de la biología de sistemas en el estudio de los procesos de aclimatación y adaptación a los factores abióticos de *E. siliculosus* (Tonon et al., 2011).

A pesar de que existen varios trabajos sobre metabolómica en algas, la mayoría de los estudios hasta ahora se centran en el metabolismo lipídico de las macroalgas marinas verdes. En este sentido, se ha investigado la variabilidad del contenido de ácidos grasos dentro del género *Codium* utilizando la GC-MS, y más de 40 compuestos volátiles se determinaron a partir de dos especies (Dembitsky et al., 2003). Las grandes variaciones en el contenido de ácidos grasos se

observaron según la especie, la ubicación y la temporada. Finalmente, Akababe y colaboradores, estudiaron la biosíntesis de PUFAs en *Ulva conglobata*, incubando los extractos crudos del alga con AA y analizando dichos extractos mediante HPLC-MS y GC-MS (Akakabe et al., 2003).

Parte Experimental

I. Instrumentación analítica

I.1. Instrumentación empleada para los ensayos bioquímicos de microalgas

La esterilización de los medios de cultivo y el material necesario para los mismos se ha realizado con un autoclave modelo Raypa stericlav-s AES 150 (Barcelona, España). Las medidas de absorbancias para la cuantificación de clorofila y carotenoides se han llevado a cabo en un espectrómetro UV/Vis modelo Ultrospec 3100 pro (Biochrom Ltd, Cambridge, Reino Unido). Las medidas de la actividad fotosintética fueron realizadas mediante un electrodo de Clark (Hansatech Instrument Ltd., Norfolk, Reino Unido). Para el conteo del número de células se ha utilizado una cámara de Neubauer y un microscopio modelo Olympus CX41 (Olympus España, S.A.U., Barcelona, España). La separación de los diversos extractos se ha llevado a cabo con la centrífuga Sigma Laborzentrifugen 4-10 (Osterode, Alemania). La liofilización de muestras se llevó a cabo en un liofilizador VirTis Bechtop (SP Scientific, Gardiner, Nueva York, Estados Unidos). Se utilizaron diferentes métodos para la ruptura de la pared celular (molino a bolas y congelación/descongelación); para la preparación de extractos de microalgas se utilizó un molino de bolas (Vibrogen-Zellmühle, Bühler, Tübingen, Germany).

I.2. Instrumentación empleada para la preparación de muestras

La sonda de ultrasonidos modelo Sonopuls HD 2200 (Bandelin, Berlín), utilizada para las extracciones de las especies químicas, estaba equipada con una punta MS72. La preparación de extractos citosólicos a partir de los diferentes órganos de ratón se llevó a cabo con un criohomogenizador modelo SPEX SamplePrep Freezer/Mill 6770 (Metuchen, Nueva Jersey, E.E.U.U). Para conseguir una completa homogenización, el extracto se sometió a una segunda homogenización con un homogenizador tipo teflón/vidrio. Los extractos citosólicos se ultracentrifugaron mediante una ultracentrífuga modelo Beckman L9-90K de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), provista de un rotor Beckman 70.1 Ti (Beckman Coulter) y tubos de policarbonato de 10 mL (Beckman Coulter).

La determinación de metales totales se realizó previa mineralización de las muestras, en reactores de teflón modelo MARS

Xpress utilizando un microondas modelo MARS (CEM corporation, Matthews, Carolina del Norte, Estados Unidos).

La determinación del contenido de proteínas en las fracciones citosólicas de los ratones se realizaron por el método de Bradford usando un espectrómetro UV/Vis modelo Thermo Spectronic Helios y (Thermo Scientific, Barcelona).

I.3. Instrumentación empleada para las separaciones cromatográficas

Para los distintos tipos de separaciones cromatográficas utilizadas en esta Tesis, se ha empleado un sistema HPLC 1100 Series de Agilent (Wilmington, DE, EE.UU), equipado con una válvula de inyección modelo 7725i Rheodyne (Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.) y una bomba cuaternaria.

La separación cromatográfica por exclusión de tamaño se ha llevado a cabo con diferentes columnas en función del rango de fraccionamiento y sus dimensiones (analíticas o preparativas). La fase estacionaria de estas columnas consta de moléculas de dextrano unidas covalentemente a agarosa fuertemente enlazada.

Para un rango efectivo de separación de 3-70 kDa se utilizó la columna Analítica, Superdex™75 10/300 GL (10 x 300 mm x 13 µm) y la columna Preparativa, Hiloal 26/60 Superdex 75 prep grade (26 x 600 mm x 34 µm). Para un rango efectivo de separación de 10-600 kDa: se utilizó la columna Analítica, Superdex 200 10/300 GL (10 x 300 mm x 13 µm). Para un rango de separación de 10-0.1 kDa se utilizó la columna Analítica, Superdex™Peptide (10 x 300 mm x 13 µm). Todas estas columnas fueron suministradas por GE Healthcare (Uppsala, Suecia).

Para llevar a cabo la SEC a escala preparativa se ha utilizado un cromatógrafo líquido de baja presión (AKTA-Prime System, Amersham Biosciences). El sistema AKTA-Prime, está equipado con un colector de fracciones, válvula de inyección y sistema de detección, ultravioleta-visible. La adquisición y tratamiento de datos se ha realizado con el programa del equipo (Primeview 5.0, Amersham Biosciences).

La cromatografía de intercambio iónico, para la especiación de yoduro inorgánico, se ha llevado a cabo en una columna G3154A/101. Para la identificación de las fitoquelatinas de Hg, la cromatografía de

fase reversa se llevó a cabo en la columna SPherisorb ODS 2 (25 cm x 4,6 mm x 5 μ m). Los estudios de especiación de Se se realizaron en las columnas de fase reversa Luna C18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μ m) o Bondclone C18 (30 cm x 3,9 mm x 10 μ m), ambas adquiridas de Phenomenex (Inc. Torrance, CA, E.E.U.U). La columna quiriral Astec Chirobiotic T (25 cm x 4,6 mm x 5 μ m), suministrada por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), se utilizó para la separación de los enantiómeros D y L de la SeMet.

Para la separación de selenoproteínas en sangre se utilizaron dos columnas de exclusión molecular HiTrap-Desalting-Sephadex G-25 Superfine (1.6 x 2.5 cm) y dos columnas de afinidad: HiTrap-heparin sepharose y HiTrap-blue sepharose de 1mL, suministradas por GE Healthcare (Uppsala, Suecia).

I.4. Espectrómetro de masas atómico

El espectrómetro de masas atómico ICP-MS, goza de un amplio reconocimiento como técnica principal para el análisis de trazas de metales. Por ello, la determinación de metales totales y metales unidos a biomoléculas en los diferentes extractos se ha realizado con el equipo ICP-MS Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokio, Japón), equipado con celda de colisión/reacción de tipo octapolo (ORC), que permite reducir significativamente las interferencias poliatómicas formadas a partir de la matriz de la muestra, reactivos utilizados para la preparación de la muestra o gases del plasma. Las interferencias poliatómicas más comunes se resumen en la tabla 4.

En la celda se utiliza He como gas de colisión e H₂ como gas de reacción.

Isótopo	Abundancia	Interferencia
⁷⁵ As	100	⁴⁰ Ar ³⁵ Cl ⁺ , ⁵⁹ Co ¹⁶ O ⁺ , ³⁶ Ar ³⁸ Ar ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ³⁷ Cl ⁺ , ³⁶ Ar ³⁹ K, ⁴³ Ca ¹⁶ O ₂ , ²³ Na ¹² C ⁴⁰ Ar, ¹² C ³¹ P ¹⁶ O ₂
¹¹⁴ Cd	28,7	⁹⁸ Mo ¹⁶ O ⁺ , ⁹⁸ Ru ¹⁶ O ⁺
⁵⁹ Co	100	⁴³ Ca ¹⁶ O ⁺ , ⁴² Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ²⁴ Mg ³⁵ Cl ⁺ , ³⁶ Ar ²³ Na ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁹ F ⁺
⁵³ Cr	9,51	³⁷ Cl ¹⁶ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁵ N ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁴ N ¹ H ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁷ O ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁸ O ⁺ , ³⁶ S ¹⁷ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹³ C ⁺
⁶³ Cu	69,1	³¹ P ¹⁶ O ₂ ⁺ , ⁴⁰ Ar ²³ Na ⁺ , ⁴⁷ Ti ¹⁶ O ⁺ , ²³ Na ⁴⁰ Ca ⁺ , ⁴⁶ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁶ Ar ¹² C ¹⁴ N ¹ H ⁺ , ¹⁴ N ¹² C ³⁷ Cl ⁺ , ¹⁶ O ¹² C ³⁵ Cl ⁺
⁶⁵ Cu	30,9	⁴⁹ Ti ¹⁶ O ⁺ , ³² S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ²⁵ Mg ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺
⁵⁶ Fe	91,66	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁵ N ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁸ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁸ O ¹ H ⁺
⁵⁷ Fe	2,19	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁷ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁹ F ⁺
²⁰⁰ Hg	23,130	¹⁸⁴ W ¹⁶ O ⁺ , ¹⁸⁶ W ¹⁴ N ⁺ , ¹⁶⁰ Gd ⁴⁰ Ar ⁺ , ¹⁹⁹ Hg ¹ H ⁺ , ¹⁸³ W ¹⁷ OH ⁺ , ¹⁸⁸ Os ¹² C ⁺ , ¹⁶⁰ Dy ⁴⁰ Ar ⁺ , ¹⁸⁶ Os ¹⁴ N ⁺ , ¹⁸⁷ Re ¹³ C ⁺ , ¹⁸¹ Ta ¹⁹ OH ⁺ , ¹⁸⁵ Re ¹⁵ N ⁺
²⁰² Hg	29,800	¹⁸⁵ Re ¹⁷ OH ⁺ , ¹⁸⁶ W ¹⁶ O ⁺ , ¹⁹⁰ Os ¹² C ⁺ , ¹⁶² Dy ⁴⁰ Ar ⁺ , ²⁰¹ Hg ¹ H ⁺ , ¹⁸⁸ Os ¹⁴ N ⁺ , ¹⁸⁶ Os ¹⁶ O ⁺ , ¹⁸⁷ Re ¹⁵ N ⁺ , ¹⁸⁹ Os ¹³ C ⁺ , ¹⁶² Er ⁴⁰ Ar ⁺ , ¹⁶⁶ Er ³⁶ Ar ⁺
⁵⁵ Mn	100	⁴⁰ Ar ¹⁴ N ¹ H ⁺ , ³⁹ K ¹⁶ O ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁵ N ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁷ O ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ²³ Na ³² S ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁹ F ⁺
⁶⁰ Ni	26,16	⁴⁴ Ca ¹⁶ O ⁺ , ²³ Na ³⁷ Cl ⁺ , ⁴³ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺
²⁰⁸ Pb	52,4	¹⁹² Pt ¹⁶ O ⁺
⁸⁰ Se	49,960	⁴⁰ Ca ₂ , ³² S ¹⁶ O ₃ , ⁸⁰ Kr, ⁴⁰ Ar ⁴⁰ Ar ⁺ , ⁴⁰ Ca ⁴⁰ Ar ⁺ , ⁶³ Cu ¹⁷ OH ⁺ , ⁷⁹ Br ¹ H ⁺ , ⁶⁴ Zn ¹⁶ O ⁺ , ⁶⁶ Zn ¹⁴ N ⁺ , ⁶⁸ Zn ¹² C ⁺ , ⁶⁴ Ni ¹⁶ O ⁺ , ⁶⁵ Cu ¹⁵ N ⁺ , ¹⁵⁹ Tb ²⁺ , ¹⁶⁰ Gd ²⁺ , ¹⁶⁰ Dy ²⁺
⁸² Se	8,840	⁸² Ar ₂ H ₂ , ³⁴ S ¹⁶ O ₃ , ¹² C ³⁵ Cl ₂ , ⁸² Kr, ⁸¹ Br ¹ H ⁺ , ⁶⁵ Cu ¹⁷ OH ⁺ , ⁶⁶ Zn ¹⁶ O ⁺ , ⁷⁰ Ge ¹² C ⁺ , ⁶⁸ Zn ¹⁴ N ⁺ , ⁶⁹ Ga ¹³ C ⁺ , ⁴² Ca ⁴⁰ Ar ⁺ , ⁷⁰ Zn ¹² C ⁺ , ⁶³ Cu ¹⁹ OH ⁺ , ¹⁶⁴ Dy ²⁺ , ¹⁶³ Dy ²⁺ , ¹⁶⁴ Er ²⁺
⁶⁴ Zn	48,89	³² S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ⁴⁸ Ti ¹⁶ O ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ⁴⁸ Ca ¹⁶ O ⁺ , ³² S ₂ ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁴ N ₂ ⁺
⁶⁶ Zn	27,81	⁵⁰ Ti ¹⁶ O ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ³² S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ , ³² S ¹⁷ O ₂ ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³² S ³⁴ S ⁺ , ³³ S ₂ ⁺

Tabla 4. Diferentes isótopos de los elementos objeto de estudio, sus abundancias relativas y las principales interferencias que afectan a cada uno de ellos.

La introducción de la muestra en la corriente de gas del plasma se ha llevado a cabo mediante el uso de un nebulizador MicroMist de Glass Expansion (Melbourne, Australia) que permite un caudal líquido de 0,05 a 0,8 mL·min⁻¹ y un caudal gaseoso entre 0,7 y 1 L·min⁻¹. Este sistema mejora considerablemente la reacción señal/ruido, minimiza el gasto de argón y tiene una elevada tolerancia a las sales disueltas. Otra ventaja de este nebulizador es su fácil acoplamiento con el sistema HPLC. Sin embargo, este nebulizador presenta algunas desventajas como las ligadas a su pobre resistencia al ácido fluorhídrico al estar

fabricado con vidrio, además, se obstruye fácilmente por acumulación de micropartículas o sólidos disueltos.

Para la calibración del equipo se eligió Li, Y, Ce y Tl (disolución de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) para la sintonía general, ya que cubre todo el rango operativo de masas medibles. La calibración se inicia en modo estándar y es seguida de una optimización en modo He o H_2 según el modo de trabajo.

La optimización del flujo de gas de reacción/colisión para la determinación de metales totales, se llevó a cabo con una muestra previamente mineralizada dividida en dos alícuotas, fortificando una de ellas a una concentración conocida. Dichas disoluciones se analizan mediante ICP-MS aplicando de forma automática una rampa de flujo de gas de reacción o colisión. La gráfica de sensibilidad (cps) de los distintos isótopos de interés de la muestra fortificada se compara con las señales obtenidas en la muestra no fortificada y la señal correspondiente a la concentración equivalente al ruido de fondo (BEC), frente al flujo de gas de colisión o reacción ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). El flujo de gas óptimo se selecciona de manera que la sensibilidad de los isótopos en ambas disoluciones, sea máxima y al mismo tiempo que la BEC sea mínima.

I.5. Espectrómetro de masas moleculares

La caracterización de las fitoquelatinas y el estudio metabólico se ha llevado a cabo en un espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo-tiempo de vuelo modelo QSTAR XL Hybrid system (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), equipado con un analizador QqQ en serie a un analizador TOF, utilizando una fuente ESI como fuente de ionización.

Antes de cada análisis, el instrumento se calibra diariamente con renina (Mr 879.9 Da; Applied Biosystems/PE Sciex, Foster City, CA, USA). El tratamiento de datos se realizó con el software del equipo, Analyst QS software.

II. Reactivos y disoluciones patrón

Todas las disoluciones acuosas se prepararon en agua ultrapura (18.2 M Ω) obtenida mediante un sistema Milli-Q Gradient de Millipore (Watford, Reino Unido) y todos los reactivos utilizados fueron de la mayor pureza disponible.

Fosfato potásico, fosfato disódico, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, nitrato de potasio, EDTA, EDTA disódico, ácido bórico, cloruro de manganeso, sulfato de zinc, sulfato de cobre, y bicarbonato sódico, utilizados para la preparación de los medios de cultivo de las algas, fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Cloruro de mercurio, ácido nítrico Suprapur 65%, peróxido de hidrógeno 33%, ácido clorhídrico, hidróxido de tetrametilamonio (TMHA) y amoníaco se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania). Metanol y etanol por Tecknokroma (Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España). Selenato de sodio y cloruro de tetraetilamonio fueron suministrados por Fluka (Buchs, Suiza). D,L-selenometionina, L-selenometionina, selenocisteína, seleno-metil-selenocisteína, selenito de sodio se adquirieron en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Finalmente, el cloruro de metilmercurio fue suministrado por Probus (Sisak, Croacia).

Las columnas de exclusión de tamaño se calibraron con los siguientes calibrantes en la experiencia de yodo: Tiroglobulina, (Tg) (660 KDa, pureza >90%), albúmina de suero bovino (BSA) (67 KDa, pureza \geq 96%), quimotripsina A (25 KDa, pureza >90%), ribonucleasa A (13.7 KDa, pureza >90%), metalotioneina I (7 KDa, pureza \geq 95%), gastrina I (2126 Da, pureza >97) y glicina 6 (Gly6) (360Da, pureza >98.5%). Todos ellos fueron suministrados por Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania) excepto la metalotioneina I, que fue suministrada por Enzo Life Sciences (Madrid, España). En la experiencia de exposición de Hg se utilizaron además otros calibrantes tales como: Ferritina (440 KDa, pureza 95%), superóxido dismutasa (SOD) conteniendo Cu y Zn (32 kDa, pureza >70%), mioglobina (14 kDa, pureza >98%), vitamina B12 (1.35 kDa, pureza >96%), glutatión reducido (307 Da, pureza >96%), arsenobetaina (AsB) (179 Da, pureza >98%). Todas ellas adquiridas de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania).

Para la validación de las metodologías analíticas empleadas para la medida de Se y SeMet en *Chlorella* se empleó el material de referencia SELM-1 (levadura enriquecida en Se) (INMS, NRC). La validación de la metodología del análisis de metales totales en suero se llevó a cabo

mediante el uso de materiales de referencia (CRMs) de metales en suero humano (Clinchek, Nivel I, Productos Químicos RECIPE, Munich, Alemania).

Los gases utilizados (argón, helio, oxígeno e hidrógeno) fueron de la más alta calidad comercial, siendo suministrados por Air Liquide España, S.A (Madrid, España).

La sintonía del ICP-MS se ha llevado a cabo con una disolución de Li, Y, Tl y Ce al 2% HNO₃, suministrada por Agilent Technologies (California, Estados Unidos), empleando una concentración de 1 µg·L⁻¹. También se utilizó una disolución multipatrón 2A, suministrada por esta casa comercial para la preparación de las curvas de calibrado.

Los reactivos utilizados para la preparación de muestras para el estudio metalómico fueron de la más alta pureza disponible. El fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF), tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) (BioUltra grado, pureza >98%), azida sódica (NaN₃), dodecilsulfato sódico (SDS), Proteasa tipo XIV se obtuvieron de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). El sulfato de amonio ((NH₄)SO₄), utilizado para precipitación de proteínas fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania).

El Tris-HCl utilizado para la preparación de la fase móvil en SEC y 2-mercaptoetanol para la especiación de Se y Hg, fueron suministrados por Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). El nitrato de amonio (NH₄NO₃) usado para la fase móvil AEC y acetato de amonio usado en SEC se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania). Finalmente, el cloruro de tetraetilamonio fue adquirido en Fluka (Buchs, Suiza).

Para los estudios de metabolómica, todos los disolventes utilizados para la preparación de muestras fueron de calidad óptima para la espectrometría de masas. El metanol y el acetonitrilo fueron adquiridos en Fisher Chemical (Geel, Bélgica), mientras que el ácido fórmico y cloroformo fueron de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania).

III. Procedimientos experimentales

III.1. Cultivos de microalgas en el laboratorio

La microalga usada en el desarrollo de esta Tesis, *Chlorella sorokiniana*, se obtuvo de la colección de cultivos UTEX (University of Texas, Austin, Estados Unidos), mantenida bajo condiciones estériles en frascos Roux en medio M-8a modificado, descrito por Cuaresma y colaboradores (Cuaresma *et al.*, 2009) (Tabla 5). Los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura a 25° C, bajo una irradiación continua de 150 μmol de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, medidos en la superficie del cultivo a partir de lámparas blancas fluorescentes acalóricas laterales que proporcionan la misma intensidad de luz en todos los cultivos y aireación constante suplementada en CO_2 (5% v/v), el cual constituye una fuente de carbono y un sistema de homogenización del medio de cultivo para evitar que no se produzcan efectos pantalla entre las células del cultivo (Figura 23).



Figura 23. Cultivo de microalgas. Cultivos de microalgas en cámara con iluminación fluorescente.

Disoluciones Stock	Concentración en el medio (g·L ⁻¹)	Composición
<i>Stock I (P-buffer)</i>	0,74	KH ₂ PO ₄
	0,26	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
<i>Stock II (Ca-Mg)</i>	0,4	Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O
	0,013	CaCl ₂ ·2H ₂ O
	3	KNO ₃
<i>Stock III</i>	0,116	EDTA
	0,0372	Na ₂ EDTA·2H ₂ O
<i>Stock IV</i>	6,18 x 10 ⁻⁵	H ₃ BO ₃
	1,30 x 10 ⁻²	MnCl ₂ ·4H ₂ O
	3,20 x 10 ⁻³	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
	1,83 x 10 ⁻³	CuSO ₄ ·5H ₂ O

En 1L de agua destilada

Tabla 5. Composición del medio M8-a modificado. Composición química del medio de cultivo utilizado en los ensayos con *C. sorokiniana*.

III.1.1. Métodos cuantitativos para medir el crecimiento de las colonias de células

III.1.1.1. Determinación del peso seco y conteo de células

Para la determinación del peso seco, se filtró una muestra de 5 mL de cultivo a través de filtros Whatman GF/F (Whatman International, Maidstone, Reino Unido) pesados previamente y lavados con agua destilada. Los filtros se secaron en una estufa a 80° C, se enfriaron en un desecador y se pesaron. La biomasa que se obtiene se calcula por diferencia de pesadas. Todas las medidas se realizaron por triplicado. El número de células se determinó mediante el conteo de éstas en una cámara de Neubauer (Figura 24) usando un microscopio óptico Olympus CX41. En dicha cámara, que posee un volumen conocido, se coloca una muestra del cultivo previamente diluida y se le añaden 50 µL de etanol por mL para fijar las células.

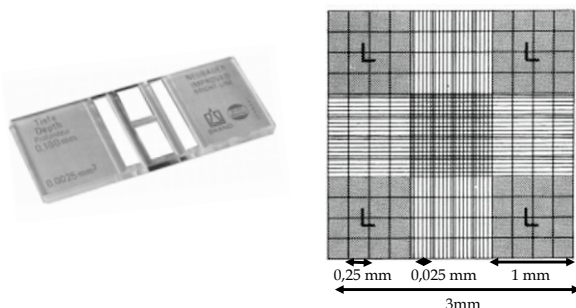


Figura 24. Cámara de Neubauer. En el centro se observa con mayor detalle las cuadrículas marcadas con L, donde se realiza el recuento celular.

III.1.1.2. Determinación de la actividad fotosintética

Cuando la suspensión celular de microalga se ilumina se desprende oxígeno que nos permite valorar el proceso fotosintético; dicha actividad fotosintética nos sirve como indicador de la viabilidad celular del cultivo. El proceso respiratorio, por el contrario, da lugar a un consumo de oxígeno en la oscuridad. Para la medida de la actividad fotosintética se utiliza un electrodo de tipo Clark (Oxygraph DW1/AD, Hansatech Instruments). Las mediciones de liberación de oxígeno se hicieron bajo saturación de luz blanca ($1000 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) o en oscuridad (respiración) a 25°C . En la figura 25 se muestra una fotografía del electrodo de Clark y un esquema de su funcionamiento.

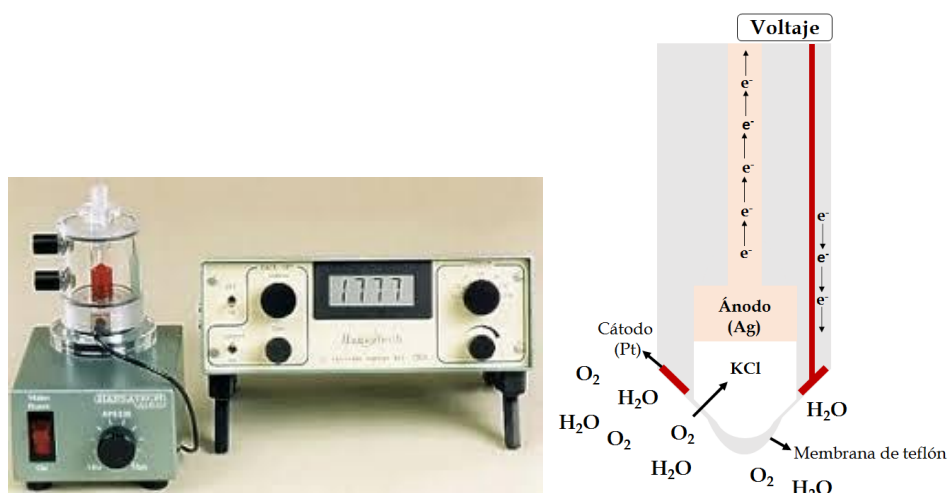


Figura 25. Fotografía de un electrodo de Clark y esquema de su funcionamiento.

La evolución de oxígeno se presenta como μmoles de O_2 producidos o consumidos por unidad de tiempo (h) y de biomasa (mg Chl).

III.1.1.3. Determinación del contenido de clorofila y carotenoides

La determinación de clorofila y carotenoides se llevó a cabo mediante modificaciones del método de Arnon (Arnon, 1949). Para ello, se centrifugó 1 mL de cultivo a 4400 rpm, eliminando posteriormente el sobrenadante y añadiendo al pellet 4 mL de metanol para llevar a cabo la extracción agitando simultáneamente en vortex durante 20 segundos. Posteriormente, la muestra se incubó durante 30 min a 60°

C a 0° C durante 10 min. A continuación, se realizó una segunda centrifugación durante 5 min a 4400 rpm para separar el pellet libre de clorofila y carotenoides. Estos componentes se cuantifican en el sobrenadante midiendo la absorbancia a 470, 653 y 665 nm en un espectrofotómetro.

Las concentraciones de clorofila (a y b) y carotenoides presentes en el extracto se calculan utilizando las expresiones matemáticas propuestas por H. Leichtenthaler.

$$Chl_a = (16,72 \cdot A_{665,2} - 9,16 \cdot A_{652,4}) \cdot 4$$

$$Chl_b = (34,09 \cdot A_{652,4} - 15,28 \cdot A_{655,2}) \cdot 4$$

$$Chl_{tot} = Chl_a + Chl_b$$

$$Carot_t = \frac{4 \cdot 1000 \cdot A_{470} - 1,63 \cdot Chl_a - 104,96 \cdot Chl_b}{221}$$

III.2. Experiencias de exposición de *Chlorella* a elementos de importancia toxicológica o esencial

III.2.1. Experiencia de exposición a yodo

Una vez que la microalga ha alcanzado su fase exponencial, el enriquecimiento de yodo se realiza mediante adición de KI al medio de cultivo de la microalga en diferentes concentraciones para estudiar la respuesta biológica del microorganismo frente a un cultivo control, al que no se le adiciona KI. De esta forma se selecciona posteriormente la concentración óptima para el estudio (que resultó ser 80 µg mL⁻¹ en el medio de cultivo). Las células de la microalga se recogieron a las 24 horas de exposición del halógeno. Durante el transcurso del experimento se recogieron alícuotas de los diferentes cultivos para llevar a cabo los estudios bioquímicos detallados anteriormente.

La determinación del contenido de yodo en la microalga se llevó a cabo en medio básico, pesando 0,25 g de extracto de alga liofilizada al que se le adicionó 10 mL de agua ultrapura y 10 mL TMHA en vaso cerrado de microondas. La mineralización se llevó a cabo a 1000 W utilizando una rampa de temperatura ambiente a 200° C durante 10 min, manteniendo esta temperatura constante durante 5 min. A continuación, los extractos mineralizados se enrasaron con agua ultrapura hasta un volumen final de 25 mL. Posteriormente, las

disoluciones se filtraron con filtros hidrófilos PVDF 0,45 μm antes de su análisis mediante ICP-MS. Finalmente, el análisis se llevó a cabo mediante adición de Rh como patrón interno a una concentración de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Todos los análisis se realizaron por triplicados.

La extracción de los compuestos de yodo solubles en agua se llevó a cabo pesando 0,2 gramos de alga liofilizada y adicionándole alícuotas de 10 mL de agua ultrapura. Las muestras se colocaron en baño de hielo para evitar sobrecalentamiento durante la extracción ultrasónica. La sonda de ultrasonidos se fijó a una potencia del 25% durante 2 min. Los extractos se centrifugaron a 4400 rpm durante 10 min. En la figura 26 se muestra la extracción secuencial empleada para el estudio.

Una vez que los compuestos solubles en agua habían sido eliminados de la muestra, al pellet resultante se le añadió una disolución tampón extractante. Esta disolución contiene Tris-HCl a pH 9, 0,1% SDS y 0,05% NaN_3 . La extracción se llevó a cabo con sonda de ultrasonidos. A continuación, los extractos se obtuvieron mediante centrifugación. Para la precipitación de proteínas a los extractos se les añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% de saturación. El pellet se recolectó por centrifugación y se redisolvió en agua, para ser posteriormente purificado por diálisis.

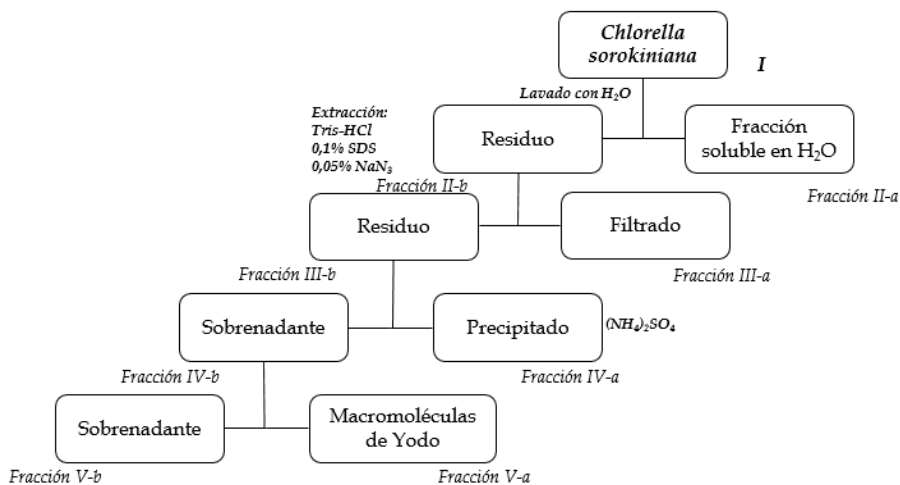


Figura 26. Diagrama de flujos de la extracción secuencial de macromoléculas de yodo en *Chlorella sorokiniana*.

Para controlar el proceso de extracción secuencial se lleva a cabo un balance de masas, determinando la concentración de yodo en cada fracción aislada. La cuantificación de yodo se llevó a cabo con el mismo procedimiento de mineralización de muestras descrito previamente, realizando el análisis mediante ICP-MS.

Para el análisis de las especies de yodo unidas a biomoléculas se extrajeron con agua (fracción IIa), la separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando la columna Superdex™ 75. La fase móvil utilizada fue una disolución 30 mM de Tris-HCl a pH 7, usando un flujo de 0,75 mL·min⁻¹. La fase móvil se preparó diariamente ajustando el pH con una mezcla HCl/H₂O ultrapura 1:1. Las condiciones operacionales usadas en este acoplamiento se encuentran resumidas en la tabla 6.

<i>Condiciones experimentales SEC analítica</i>	
Columna	Superdex TM -75 y Superdex 200 (300 x 10mm x 13µm)
Rango de Resolución	3-70 kDa, 10-600 kDa respectivamente
Fase Móvil	Tris-HCl 30 mmol L ⁻¹ (pH 7)
Flujo	0,75 mL min ⁻¹
Volumen de Inyección	50 µL
Longitud de Onda UV	254 nm
<i>Condiciones experimentales SEC preparativa</i>	
Columna	Hiload 26/60 Superdex 75 (600 x 26 mm x 34 µm)
Rango de Resolución	3-70 kDa
Fase Móvil	Tris-HCl 30 mmol L ⁻¹ (pH 7)
Flujo	2 mL min ⁻¹
Volumen de Inyección	2 mL
Longitud de Onda UV	254 nm
<i>Condiciones experimentales AEC</i>	
Columna	G3154A/101
Fase Móvil	NH ₄ NO ₃ 20 mmol L ⁻¹ (pH 5,6)
Flujo	1 mL min ⁻¹
Volumen de Inyección	50 µL
<i>Condiciones experimentales ICP-ORS-MS</i>	
Forward Power	1100 W
Flujo de gas de Plasma	15,0 L·min ⁻¹
Flujo de gas Auxiliar	1,05 L·min ⁻¹
Flujo de carrier gas	0,9 L·min ⁻¹
Profundidad de muestreo	8 mm
Conos	Ni
Flujo de Helio	3,9 mL·min ⁻¹
Qoct	-18 V
Qp	-16 V
Tiempo de análisis	0,3 por isótopos
Isótopos de análisis	¹²⁷ I

Tabla 6. Condiciones instrumentales usadas para SEC, AEC e ICP-ORS-MS.

Para la cuantificación de yoduro, la fracción molecular que corresponde a esta fracción se sometió a una segunda separación cromatográfica mediante cromatografía AEC. Para ello las condiciones experimentales se optimizaron previamente con patrones de yoduro y yodato. Las condiciones óptimas utilizadas se muestran en la tabla 6.

La fracción correspondiente a las macromoléculas de yodo (fracción Va) se separó cromatográficamente usando la columna Superdex 200. La fase móvil utilizada fue Tris-HCl 30 mM a un flujo de 0,75 mL·min⁻¹.

III.2.2. Experiencia de exposición a selenio

El medio de cultivo M8 modificado se enriqueció con Se en forma de selenato de sodio utilizando los siguientes niveles de concentración: 0, 20, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500 µg·mL⁻¹. Para determinar los efectos de la absorción del Se en el alga, se han monitorizado en el transcurso del experimento los parámetros de crecimiento del alga descritos anteriormente.

Para la determinación del contenido total de Se en el pellet obtenido tras centrifugación del cultivo, se pesan aproximadamente 40 mg de pellet y se somete a una digestión ácida con 8 mL de HNO₃ (65% m/v) y 2 mL de H₂O₂ (30% m/v). Las muestras se digieren a 1000 W utilizando una rampa de temperatura ambiente a 175° C durante 15 min, manteniendo esta temperatura constante durante 40 min. En ausencia de un material de referencia de microalga enriquecido con Se, se utilizó como tal el CRM SELM-1 (Selenium Enriched Yeast Certified Reference Material, NRC, Canada), el cual se analizó para validar la metodología analítica en la determinación de Se total mediante ICP-ORS-MS.

La mineralización del medio de cultivo obtenido por centrifugación, se llevó a cabo tomando una alícuota de 5 mL del medio y tratándola con 6 mL de HCl (37% m/v) y 2 mL de HNO₃ (65% m/v). El programa de temperatura empleado utiliza una rampa desde temperatura ambiente hasta 165° C en 10 min y 25 min de mantenimiento a esta última temperatura.

El uso de diferentes disolventes para la extracción de especies de Se del alga sugiere un fraccionamiento selectivo de compuestos de Se en función de su afinidad por estos disolventes. Para estos fines, se utilizaron los siguientes disolventes: (i) extracción con agua, (ii) extracción con Driselasa para liberar los compuestos asociados a la

pared celular,(iii) SDS para extraer las selenoproteínas insolubles en agua y (iv) enzimólisis con lipasa y pronasa para liberar y digerir selenoproteínas residuales que producen especies de Se con bajo peso molecular.

La determinación de los selenoaminoácidos presentes en las muestras del alga se llevó a cabo mediante extracciones enzimáticas. Para ello, se pesaron 20 mg de muestra pulverizada y 20 mg de Proteasa XIV. Esta mezcla se diluyó a 5 mL de agua Milli-Q. Para favorecer la extracción de las especies de Se, la mezcla pellet-proteasa, se utiliza una sonda de ultrasonidos, durante 2 min al 25% de potencia. Posteriormente, la solución se centrifugó a 4400 rpm durante 5 min. El sobrenadante resultante se separa y el residuo se somete a una segunda extracción, reuniendo finalmente ambos sobrenadantes que se filtran a través de filtros de 0,45 μm antes de su introducción en el acoplamiento HPLC-ICP-ORS-MS.

Para el análisis de los selenoaminoácidos, la separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando la columna de fase reversa C18 Phenomenex Luna C18 (250 x 4.6mm, 5 μm). La fase móvil utilizada fue una disolución a 0,075% TEAC ajustada a pH 4,5 usando un flujo de 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$. La separación quiral de los enantiómeros de la SeMet se llevó a cabo utilizando la columna Astec Chirobiotic T (250 x 4,6 mm, 5 μm). La separación cromatográfica de los extractos celulares se realizó utilizando la columna SuperdexTM75. La fase móvil utilizada fue una disolución de acetato de amonio 20 mM a pH 7,4, con un flujo de 0,7 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ y una inyección de volumen de 20 μL . Las condiciones operacionales usadas en este acoplamiento se encuentran resumidas en la tabla 7.

Las condiciones experimentales utilizadas en el ICP-ORS-MS fueron las mismas descritas anteriormente con la excepción del uso de hidrógeno como gas de reacción para la monitorización de los isotópos más abundantes del Se, ⁸⁰Se y ⁷⁸Se. Se monitoriza la medida de los isotópos ⁷⁷Se, ⁷⁸Se, ⁸⁰Se, ⁸²Se, pero sólo se utilizó para la cuantificación el ⁸⁰Se.

<i>Condiciones experimentales RPC</i>	
Columna	Phenomenex Luna C18 (250 x 4,60 mm x 5µm) Astec
Fase Móvil	TEAC, pH 4,5
Flujo	1 mL min ⁻¹
	0-5,1 min RPC 5,1-6,5 min Quiral 6,15-8,5 min RPC
<i>Condiciones experimentales SEC analítica</i>	
Columna	SuperdexTM-75
Rango de Resolución	3-70 kDa
Fase Móvil	20 mmol L ⁻¹ acetato de amonio (pH 7,4)
Flujo	0,7 mL min ⁻¹
Volumen de Inyección	20 µL
Longitud de Onda UV	254 nm

Tabla 7. Condiciones instrumentales usadas para RPC y SEC-HPLC.

III.2.3. Experiencias de exposición a mercurio

La microalga *Chlorella sorokiniana* se cultivó en matraces erlenmeyer de 5 L en medio M8 modificado (tal como se describió anteriormente). Una vez que la microalga alcanzó la fase de crecimiento exponencial, el medio de cultivo se expuso a diferentes concentraciones de Hg en forma de cloruro de mercurio para estudiar la concentración subletal de dicho metal. Para ello se expusieron diferentes cultivos a diversas concentraciones del elemento durante nueve días: (i) Control (cultivo no expuesto), (ii) Cultivo expuesto a 0,5 mg·L⁻¹ HgCl₂, (iii) Cultivo expuesto a 1 mg·L⁻¹ HgCl₂, (iv) Cultivo expuesto a 5 mg·L⁻¹ HgCl₂, (v) Cultivo expuesto a 10 mg·L⁻¹ HgCl₂. Durante el transcurso del experimento se recogieron alícuotas de los diferentes cultivos para llevar a cabo los estudios bioquímicos. La concentración subletal fue 1 mg·L⁻¹ en el medio de cultivo. Las células de la microalga se recogieron a los 9 días de exposición a Hg mediante centrifugación.

Para la preparación de extractos, las células recogidas se lavaron con agua destilada previamente. Las biomoléculas que contienen metal fueron extraídas con una solución tampón de acetato de amonio que contiene 20 mM a pH 7,4, 1 mM TCEP como agente de reducción para evitar la formación de enlaces disulfuro, y 1 mM PMSF

para la inhibición de proteasas. La extracción se llevó a cabo usando un molino de perlas para la rotura de la pared celular. Los extractos se ultracentrifugaron a 120.000 g durante 1 hora a 4° C, se almacenaron en atmósfera inerte para evitar la oxidación por aire y se mantuvieron a -80° C hasta su análisis.

La separación cromatográfica de los extractos celulares se llevó a cabo utilizando la columna Superdex™75. Debido a la baja masa molecular de los compuestos, se utilizó la columna complementaria Superdex™Peptide. La fase móvil utilizada para ambas columnas fue una disolución de acetato de amonio 20 mM a pH 7,4 con un flujo de 0,7 mL·min⁻¹ y se inyectaron 20 µL de muestra.

Los extractos celulares se ultrafiltraron utilizando filtros de corte Amicon de 3 kDa (Millipore, Darmstadt, Alemania). Un volumen de 500 µL de extracto celular se transfirió a los filtros y se centrifugó a 4000 g, durante 60 min a 4° C. Los extractos de masa molecular menor a 3 kDa se llevaron a sequedad bajo corriente de N₂ y se reconstituyeron con fase móvil A. Antes de la inyección, las muestras fueron filtradas utilizando filtros de 0.45 µm de PVDF.

Los extractos de bajo peso molecular fueron inyectados en cromatografía en fase reversa utilizando la columna SPherisorb ODS 2 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm). El procedimiento para la separación cromatográfica se resume en la tabla 8. Además, se aplicó el sistema ESI-QqQ-TOF-MS como detector. Para ello, el flujo de la columna se dividió con un conector en T, desviando un flujo de 300 µL min⁻¹ a la fuente ESI. Los parámetros para el sistema QqQ-TOF fueron optimizados para obtener la mayor sensibilidad en el modo de ion positivo de adquisición (Tabla 8). Para la adquisición de espectros MS/MS, se utilizó nitrógeno como gas de colisión y la energía de colisión utilizada para la fragmentación de los iones con m/z 740 y 683 fue de 30 eV y 35 eV, respectivamente.

Las condiciones experimentales utilizadas en el sistema ICP-ORS-MS fueron las mismas descritas anteriormente. Se empleó He a un flujo de 3,2 mL·min⁻¹ como gas de colisión y se monitorizaron los siguientes isótopos: ⁵³Cr, ⁵⁵Mn, ⁶³Cu, ⁶⁵Cu, ⁶⁴Zn, ⁶⁶Zn, ⁷⁵As, ⁵⁷Fe, ¹⁰³Rh, ¹¹⁴Cd, ²⁰¹Hg y ²⁰²Hg.

<i>Condiciones experimentales SEC analítica</i>	
Columna	Superdex™-75 y Superdex™Peptide
Rango de Resolución	3-70 kDa y 0,1-10 kDa, respectivamente
Fase Móvil	Acetato de amonio 20 mmol L ⁻¹ (pH 7,4)
Flujo	0,7 mL·min ⁻¹
Volumen de Inyección	50 µL
Longitud de Onda UV	254 nm
<i>Condiciones experimentales RPC</i>	
Columna	SPherisorb ODS 2 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm)
Fases Móviles	FM A: 0,1% HF en H ₂ O FM B: 0,25% HF en MeOH
Gradiente	0-10 min 99,5% FM A 10-12 min 85% FM A 16-30 min 50% FM A 30-40 min 99,5% FM A
Flujo	1 mL·min ⁻¹
Volumen de Inyección	50 µL
<i>Condiciones experimentales DI-ESI-QqQ-TOF-MS</i>	
Flujo	5 µL·min ⁻¹
Rango de masa	200-1200
Tiempo de análisis	0,2 min
Voltaje de ionización	3300 V
Gas de cortina	1,48 L·min ⁻¹
Gas de nebulización	1,56 L·min ⁻¹
Temperatura de la fuente	400° C

Tabla 8. Condiciones instrumentales usadas para RPC, SEC-HPLC y DI-ESI-QqQ-TOF-MS.

III.2.4. Estudios de exposición mercurio y selenio

Las células de *C. sorokiniana* se expusieron a diferentes concentraciones de MeHg para determinar la concentración subletal. Las concentraciones de MeHg ensayadas fueron en el rango de 50 a 1000 µg·L⁻¹, siendo 400 µg·L⁻¹ la concentración subletal de MeHg seleccionada. Se llevaron a cabo experimentos de exposición durante tres semanas, exponiendo a los cultivos a concentraciones de SeMet

y/o MeHg. Las formas quirales de SeMet fueron D, L y la mezcla racémica de ambos enantiómeros (Tabla 9). Las condiciones de los cultivos se mantuvieron sin modificaciones respecto a los ensayos realizados anteriormente. Diariamente, desde el comienzo del ensayo se recogen por centrifugación alícuotas para el estudio de los valores de crecimiento, como para la determinación de Se y Hg total y de sus especies.

Los cultivos de *C. sorokiniana* se centrifugaron para separar el pellet del medio de cultivo. El medio de cultivo se filtró usando filtros de 0.45 µm (PVDF) y se inyectaron en el sistema HPLC-ICP-ORS-MS. El pellet obtenido fue congelado en nitrógeno líquido para la rotura de la pared celular y posteriormente liofilizado. La extracción de las especies de Se y Hg se llevó a cabo mediante el uso de sonda de ultrasonidos con Proteasa tipo XIV y disolución de 2-mercaptoetanol a pH 4.3. Este valor de pH se selecciona como óptimo para obtener buenas recuperaciones, tanto de las especies de Hg como las de Se. La extracción se realiza con sonda de ultrasonidos durante 2 min al 25% de potencia. Tras la sonicación se centrifuga durante 5 min a 6.000 rpm, el sobrenadante se separa y el residuo se somete a una segunda extracción, reuniendo ambos sobrenadantes que se filtran antes de inyectarlos en el acoplamiento HPLC-ICP-ORS-MS.

Cultivo	D,L-SeMet	D-SeMet	L-SeMet	MeHg⁺
A (C-Control)	-	-	-	-
B (C-7Hg)	-	-	-	T=7
C (C-1D,LSe+7Hg)	T=1	-	-	T=7
D (D-1LSe+7Hg)	-	-	T=1	T=7
E (E-1LSe+7Hg)	-	T=1	-	T=7
F (F-1D,LSe+1Hg)	T=1	-	-	T=1
G (G-1D,LSe+1Hg)	-	-	T=1	T=1
H (H-1DSe+1Hg)	-	T=1	-	T=1

Tabla 9. Experimento de exposición de *C. sorokiniana* a mercurio y selenio.

Para el análisis de los selenoaminoácidos y las especies de Hg, la separación se llevó a cabo utilizando la columna de fase reversa C18 Phenomenex Luna (250 x 4.6 mm, 10 µm). La separación quiral de los enantiómeros de la SeMet se llevó a cabo utilizando la columna Astec Chirobiotic T (250 x 4.6 mm, 5 µm). En la tabla 10 se resumen las condiciones experimentales utilizadas en el desarrollo de este trabajo.

Para el análisis simultáneo de Se y Hg, la separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando un acoplamiento de columnas que se diseña en el propio laboratorio. Para ello se trabaja con dos válvulas Rheodyne modelo 7725i, empleándose una de ellas para la inyección de la muestra y conectando la segunda válvula a la salida de la columna de la fase reversa. En esta segunda válvula, en el lugar que suele ocupar el bucle de muestra se conecta la segunda columna, columna quirral, que permite la separación de los enantiómeros de SeMet.

Tras la elución de las primeras especies de Se y antes de eluir la SeMet, se cambia la segunda válvula de la posición de carga a inyección, activando el paso de la fase móvil por esta segunda columna. Una vez, que la SeMet llega a la columna quirral, se vuelve a activar la posición de carga, anulando de esta forma el paso de fase móvil por esta columna y forzando así el resto de especies de Se lleguen al detector, sin atravesar la columna quirral. Una vez que todas las especies de Se, han eluido de la columna de fase reversa, se vuelve a activar la columna quirral, eluyendo de la misma los dos enantiómeros de la SeMet. Cuando todas las especies de Se son detectadas en el detector, se anula la columna quirral y se cambia la fase móvil para favorecer la elución de las especies de Hg retenidas en la fase reversa.

<i>Condiciones experimentales RPC y Quiral</i>			
Columna RP	Phenomenex Luna C18 (250 x 4,60 mm, 10µm)		
Columna Quiral	Astec Chirobiotic T (250 x 4,60 mm, 5µm)		
Fase Móvil	A: 0,075% TEAC pH 4,5 B: 0,1% 2 mercaptoetanol , 0,06 M acetato de amonio, 5% metanol a pH 4,5		
Gradiente	Tiempo	Columna	Fase móvil
	0-5 min	RPC	A
	5-6,7 min	RPC + Quiral	A
	6,7-9 min	RPC	A
	9-13 min	RPC + Quiral	A
	13-25 min	RPC	B

Tabla 10. Condiciones experimentales óptimas para el análisis mediante RPC y Quiral.

Las condiciones experimentales utilizadas en el ICP-ORS-MS fueron las mismas descritas anteriormente. Se utilizó H₂ como gas de reacción para la monitorización de las isótopos más abundantes del Se. Los isótopos monitorizados fueron ⁷⁷Se, ⁸⁰Se, ⁸²Se, ¹⁹⁸Hg, ²⁰²Hg.

III.3. Evaluación de la biodisponibilidad de selenio en *Chlorella sorokiniana* enriquecida en selenio tras una digestión gastrointestinal “*in vitro*”

La principal especie de Se en la microalga *Chlorella sorokiniana* enriquecida en Se es la SeMet. La biodisponibilidad va a depender de la digestión, absorción, transporte y biotransformación de Se en formas biológicamente activas. Una manera sencilla de llevar a cabo este tipo de estudios es aplicando un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*.

La digestión *in vitro* de las muestras de *C. sorokiniana* se basó en la simulación del proceso de digestión gastrointestinal humana. Para ello, se siguió el procedimiento descrito por Bathia y colaboradores (*Bathia et al., 2013*) en dos pasos, correspondientes a las condiciones en el estómago y el intestino.

En la simulación gástrica, 0.2 g de muestra de *Chlorella* se incubaron con 4 mL de jugo gástrico compuesto por 1% de pepsina en una disolución de 0,15 M de NaCl a pH 2 acidificado con HCl. Dicha mezcla se mantuvo en agitación a 37° C (temperatura corporal) en un agitador orbital-horizontal a 150 r.p.m durante 4 horas. Una vez terminada la digestión gástrica, se ajustó el pH a 6,8 con una solución 2 M de NaHCO₃ y se le adicionaron 5 mL de jugo intestinal compuesto por 3% pancreatina, 1,5% amilasa y 1% sales biliares disueltas en 0,15 M de NaCl. Nuevamente la mezcla se incubó durante 4 horas a 37° C.

Tras la hidrólisis enzimática, las muestras se centrifugaron a 7.500 g durante 20 min a 4° C. Los sobrenadantes se separaron y se conservaron bajo atmósfera de argón a -20° C. El residuo sólido se conservó para el análisis de Se total.

Para un análisis preliminar de los compuestos de Se en el extracto gastrointestinal, la separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando la columna Superdex™ 75. La fase móvil utilizada fue una disolución 20 mM de acetato de amonio a pH 7,4, usando un flujo de 0,75 mL·min⁻¹. Para la cuantificación de SeMet, la separación se llevó a cabo utilizando la columna de fase reversa C18 Phenomenex Luna (250 x 4.6 mm, 10 µm). Las condiciones operacionales usadas en estos dos acoplamientos fueron las mismas descritas en la tabla 7.

III.4. Uso de la microalga *Chlorella* enriquecida en selenio como alimento en el ratón de laboratorio *Mus musculus*

Para el experimento de exposición a la microalga *Chlorella* enriquecida en Se, se utilizaron 30 ratones machos de 7 semanas de edad y de un peso aproximado entre 20 y 28 gramos de la especie modelo *M. Musculus*, variedad BALB/cByJ, suministrado por Charles River (Barcelona, España). Estos ratones se mantuvieron en jaulas metabólicas acondicionadas durante todo el experimento sometiéndoles a ciclos de luz/oscuridad cada 12/24 horas. Se le administró una dieta estándar y agua durante una semana antes del inicio del experimento para lograr su aclimatación.

Los animales se dividieron en cinco grupos: (i) **grupo control**, alimentado con una dieta estándar, (ii) **grupo control alga**, alimentado con una dieta estándar suplementada con alga *Chlorella* no expuesta a Se, (iii) **grupo control Se**, alimentado con una dieta deficiente en Se suplementado con alga expuesta a Se hasta lograr una concentración de $0,15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, (iv) **grupo Se 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$** , alimentado con una dieta estándar suplementada con alga expuesta a Se hasta lograr una concentración de $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y (v) **grupo Se 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$** , alimentado con una dieta estándar suplementada con alga hasta una concentración de $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Figura 27).

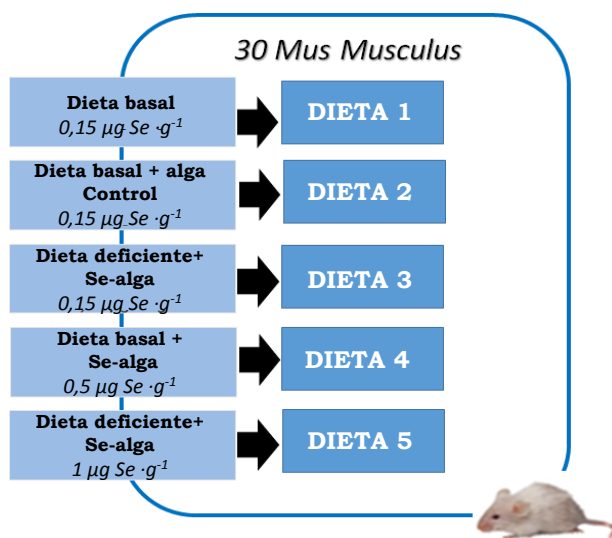


Figura 27. Dietas usadas para evaluar el efecto del alga enriquecida en selenio en *Mus Musculus*.

III.4.1. Manipulación de los animales de experimentación

Durante el periodo del experimento, los animales se pesaron para estudiar variaciones de peso según la dieta ingerida. A las 4 semanas del experimento, los animales se anestesiaron por inhalación individual de isoflurano y se les extrajo la sangre mediante punción cardiaca sobre el ventrículo izquierdo. Se diseccionaron con la ayuda de un bisturí de cerámica y se le extrajeron los órganos; hígado, cerebro, riñón y pulmones de cada animal. Estos órganos se pesaron en viales Eppendorf, se limpiaron con una solución de NaCl al 0.9% y una vez secos se homogeneizaron con nitrógeno líquido y pulverizados con la ayuda de un criohomogenizador durante 1 minuto a velocidad de 15 pulsos por segundo.

Los animales se manipularon de acuerdo con las normas establecidas por la Comunidad Europea. La investigación se llevó a cabo después de la aprobación por el Comité Ético de la Universidad de Huelva.

III.4.2 Determinación multielemental en suero y tejidos

Para la determinación multielemental en los diferentes tejidos y suero, se pesaron exactamente 100 mg de suero o tejidos pulverizados en reactores de teflón MiniExpress de 5 mL y se añadieron 800 μ L de una mezcla de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (4:1). Trascorridos 10 min de pre-digestión en recipiente abierto, se lleva a cabo el ataque ácido en un horno de microondas. La mineralización se llevó a cabo a 400 W utilizando una rampa de temperatura ambiente a 160° C durante 15 min, manteniendo esta temperatura durante 40 min. A continuación, los extractos mineralizados fueron enrasados con agua ultrapura (Milli-Q) hasta un volumen final de 2 mL. Las disoluciones se filtraron con filtros hidrófilos PVDF 0.45 μ m antes de su análisis mediante ICP-MS. El análisis se llevó a cabo mediante adición de Rh como patrón interno a una concentración de 1 μ g·mL⁻¹. Todos los análisis se realizaron por triplicado. La validación de la metodología se llevó a cabo mediante el uso de materiales de referencia (CRMs) de metales en suero humano (Clinchek, Nivel I, Productos Químicos RECIPE, Munich, Alemania).

III.4.3. Preparación de extractos citosólicos para estudios metalómicos

Para la extracción de las proteínas citosólicas se añaden 3 mL de disolución tampón extractante por cada gramo de órgano criohomogenizado. Esta disolución contiene acetato de amonio 25 mM a pH 7.2, para evitar desnaturalización de las proteínas, 100 mM de TCEP, para evitar la formación de puentes disulfuros y PMSF 1 mM como inhibidor de proteasas. La homogenización de los órganos pulverizados con la disolución de extracción se lleva a cabo en un homogenizador vidrio/teflón, el cual se utiliza durante 5 periodos de 10 segundos a 4° C. A continuación, los extractos se centrifugaron a 45.000 rpm durante 1 h a 4° C y el sobrenadante se almacenó en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación a -80° C.

III.4.4. Cuantificación de selenoproteínas en suero mediante HPLC-ICP-MS

La cuantificación de selenoproteínas se ha llevado a cabo por análisis mediante dilución isotópica (IDA), empleando acoplamientos multidimensionales que conectan el sistema HPLC con el ICP-ORS-MS.

Las muestras de suero se filtraron a través de filtros Iso-disco-poli (difluoruro de vinilideno) (20 mm de diámetro, tamaño de poro, 0,2-micras) para evitar la sobrecarga de la columna o posible obstrucción. La especiación de Se se llevó a cabo mediante el sistema 2D/SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-MS para obtener la resolución completa de las especies de Se de baja masa molecular, así como las proteínas de Se: SeP, GPx y SeAlb.

La separación de los analitos se realizó por acoplamiento de dos columnas de exclusión molecular (HiTrap-Desalting-Sephadex G-25 Superfine) de 5 mL conectadas en serie a dos columnas de afinidad; una columna de heparina-Sepharose de 1 mL (HPE-HP) y una columna de 1 mL de Blue-Sephadex (Blue-HP) interconectadas por una válvula de seis vías.

El acoplamiento SD/SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-MS se llevó a cabo mediante la conexión de la salida de la unidad cromatográfica con una pieza en forma de T y ésta con la entrada del nebulizador Micromist del ICP-MS por medio de un tubo de PEEK de 30cm (0,6 mm de diámetro interno). El análisis por dilución isotópica se realizó

mediante la introducción directa de ^{74}Se a través del conector T en el ICP-ORS-MS en concentración de $5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. La especiación de Se en suero por 2D/SE-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-MS se llevó a cabo utilizando las condiciones operacionales que se resumen en la tabla 11.

<i>Condiciones experimentales 2D/SE-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-MS</i>	
Loop de muestra	100 μL
Flujo de entrada	1,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Fase Móvil A	0,05 M acetato de amonio pH 7,4
Fase Móvil B	1,5 M acetato de amonio pH 7,4
Gradiente	0-7 min 100% A 7-18 min 100% B 18-20 min 100% A
Posición de válvulas	1-10 min Inyección 10-17 min Carga 17-20 min Inyección
<i>Condiciones experimentales ICP-ORS-MS</i>	
Radiofrecuencia	1500 W
Flujo de gas de plasma	15.0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Flujo de gas auxiliar	1.00 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Flujo de gas portador	0.15 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Conos	Ni
Flujo de Hidrógeno	4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Qoct	-18 V
Qp	-16 V
Tiempo de análisis	0.3 por isótopos
Isótopos monitorizados	^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se , ^{82}Se , ^{79}Br , ^{81}Br y ^{83}Kr

Tabla 11. Condiciones experimentales óptimas para el análisis mediante 2D/SE-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-MS

III.4.5. Estudio metabolómico en suero e hígado de ratón

Para la extracción de metabolitos se empleó un método de extracción secuencial en dos etapas. En un primer paso, se eliminaron las proteínas y se extrajeron los metabolitos polares y en una etapa final

se recuperaron los metabolitos más lipofílicos. Para la extracción de metabolitos en suero, se tomaron 100 μL de muestra de suero en Eppendorf y se añadieron 400 μL de una mezcla metanol y etanol (1:1 v/v). Tras 5 min de agitación en vórtex a temperatura ambiente, se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min a 4° C. El sobrenadante resultante se toma cuidadosamente para evitar posible contaminación con las proteínas precipitadas y se transfiere a otro tubo Eppendorf. El extracto se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno para posteriormente reconstituir el residuo con 100 μL de mezcla metanol/agua (4:1 v/v). Tras agitación breve en un vórtex, la muestra se somete a nueva centrifugación (4000 rpm, 4° C, 10 min) para recuperar el sobrenadante limpio y obtener así el extracto polar.

Por otro lado, el precipitado que anteriormente se había obtenido, se somete a un segundo proceso de extracción para la obtención del extracto lipofílico, añadiendo 400 μL de una mezcla cloroformo/metanol (1:1 v/v). La mezcla se agita (5 min) y se centrifuga (10.000 rpm, 4° C, 10 min). Por último el sobrenadante se lleva a sequedad y se reconstituye con 100 μL de diclorometano/metanol 60:40, con una centrifugación final (10.000 rpm, 4° C, 10 min) para eliminar los restos de partículas en suspensión.

Para la extracción de los metabolitos en hígado, se tomaron 30 mg de muestra en Eppendorf y se añadieron 300 μL de metanol al 0.1 % de ácido fórmico. Tras 2 min de agitación a temperatura ambiente, se centrifuga y el sobrenadante resultante se transfiere a otro tubo Eppendorf. El pellet resultante se somete a un segundo proceso de extracción con una mezcla cloroformo/metanol (2:1 v/v). La mezcla se agita y se centrifuga para obtener el extracto apolar. Para su análisis mediante espectrometría de masas con electrospray, los extractos deben ser acidificados con ácido fórmico al 0,1% (v/v) para favorecer la ionización en modo positivo.

Para la obtención de los perfiles metabolómicos de las muestras de suero e hígado se empleó un espectrómetro de masas en tándem con fuente de electrospray (ESI-QqQ-TOF), cuya elevada resolución permite prescindir del filtro cromatográfico. Además, para cubrir el mayor rango posible de metabolitos se trabajó en modo de ionización tanto positivo como negativo.

El extracto acidificado se introduce directamente en el espectrómetro de masas a un flujo de 0,5 $\mu\text{L min}^{-1}$, empleando para ello una bomba de infusión integrada. Los datos fueron adquiridos en modo

positivo en el rango de masas comprendido entre 50-1100 uma, durante un tiempo total de análisis de 0,2 minutos.

Las condiciones de trabajo fueron optimizadas para obtener la mayor sensibilidad y reproducibilidad en los resultados. El voltaje de ionización (Ion Spray voltage, IS) se ajustó a 3300 V, con unos flujos de gas de cortina y de nebulización de 1,13 y 1,56 L min⁻¹, respectivamente. La temperatura de la fuente se ajustó a 60° C, con potenciales de trabajo de 60 V (declustering potential, DP) y 250 V (focusing potential, FP). Para el análisis en modo negativo solo se modificaron algunos parámetros respecto al método anterior: IS -4000 V; DP -100 V y FP a -250 V.

Resultados y Discusión

Capítulo 1

Especiación de yodo en la microalga *Chlorella vulgaris*
enriquecida en este elemento en el medio de cultivo

Iodine speciation in iodine-enriched microalgae *Chlorella vulgaris*

(Pure and Applied Chemistry, 2010, 82, 473-481)

Verónica Gómez-Jacinto, Ana Arias-Borrego, Tamara García-Barrera, Inés Garbayo, Carlos Vilchez and José Luis Gómez-Ariza

El yodo es un elemento esencial por su importancia en las funciones fisiológicas de los seres humanos y constituye aproximadamente un 0.00004% del total del peso del cuerpo humano. Asimismo, el yodo es un componente esencial en la síntesis de las hormonas tiroideas T₄ y T₃; estas hormonas son necesarias para el control del metabolismo celular, el crecimiento, el desarrollo de las estructuras del cuerpo, así como la función y el desarrollo neuronal. El cuerpo humano no puede sintetizar este elemento por lo que la fuente más importante de yodo en la población es la ingestión dietética. Por ello, la concentración de yodo en los alimentos tiene que ser controlada siendo la ingesta diaria recomendada en adultos de 150 a 200 µg, niveles que se alcanzan con dificultad, pudiendo dar origen a problemas en la salud, principalmente bocio y cretinismo. La principal fuente de yodo en la nutrición es el pescado de origen marino, la leche y la carne.

El objetivo principal de este capítulo es estudiar de forma preliminar las especies de yodo acumuladas en la microalga *Chlorella*, con el objetivo final de conseguir un alimento funcional rico en yodo basado en esta microalga. Para ello se ha desarrollado un protocolo de extracción y fraccionamiento apropiado para la biomasa de la microalga *Chlorella*, explorando la aplicabilidad de la técnica ICP-MS para la detección y cuantificación de especies de yodo.

Para ello, se ha llevado a cabo un ensayo de exposición del alga a yodo, en forma de yoduro, utilizando diferentes concentraciones del elemento durante un período de 24 horas. La respuesta biológica del alga *Chlorella* a la presencia de yoduro en el medio está ligada a la concentración del halógeno, encontrándose el óptimo en 80 µg ml⁻¹ de yoduro en el medio de cultivo.

La determinación de yodo total en la biomasa celular liofilizada se ha realizado mediante ICP-MS, tras una extracción alcalina con hidróxido de tetrametilamonio asistida por energía de microondas. Se comprobó que el contenido de yodo aumenta en la biomasa de forma correlativa a la concentración de yoduro en el medio de cultivo, obteniéndose el máximo de acumulación de este elemento en la biomasa con 80 µg ml⁻¹ en el medio de cultivo.

El análisis metalómico de la fracción soluble en agua se ha realizado mediante el acoplamiento SEC a ICP-MS obteniéndose los correspondientes perfiles de yodo. Para ello se utilizó una columna analítica Hiloal 26/60 Superdex™ 75 (rango útil de separación de 3-70 KDa). El cromatograma SEC-ICP-MS correspondiente al extracto

soluble muestra varias biomoléculas unidas a yodo en el cultivo expuesto; una de ellas en el límite de exclusión de la columna, otra con una masa molecular que puede ser relacionada con la T₃ por el tiempo de retención y un último pico que coincide con el tiempo de retención del yoduro.

Una vez obtenido el perfil cromatográfico de yodo, se aisló la fracción de menor masa molecular mediante SEC preparativa, con objeto de identificar dichas especies. Para ello la fracción se purificó mediante una segunda dimensión cromatográfica basada en el uso de la cromatografía AEC, utilizando una columna G3154A/102. Se detectaron dos picos con tiempos de retención correspondientes al yoduro y yodato. El 75% del yodo total de esta fracción corresponde al yoduro y el resto al yodato.

El estudio metalómico se realizó también en la fracción macromolecular obtenida a partir del alga, utilizando para ello una columna analítica Hiloal 16/600 Superdex 200. El perfil yodo-biomoléculas en la fracción macromolecular del extracto muestra cuatro picos; uno de ellos en el límite de exclusión de la columna, otro con una masa molecular de 600 kDa, un tercer pico con un tiempo similar a masas de 160 kDa y un último pico a 60 kDa.

El uso de un procedimiento de extracción secuencial y cuantificación selectiva de yodo por ICP-MS como detector representa una herramienta de gran valor para la caracterización de la presencia de moléculas de yodo acumuladas en la microalga. Este trabajo muestra por primera vez los perfiles de yodo unido a biomoléculas presentes en *Chlorella sorokiniana* y propone las condiciones experimentales de enriquecimiento que hacen posible que dicha microalga constituya un alimento funcional rico en yodo para el consumo humano. No obstante, antes de su posible uso como alimento funcional, sería necesario estudiar la biodisponibilidad de yodo en la microalga para comprobar que se cumplen los requerimientos alimenticios de yodo en humanos. Asimismo, sería importante realizar estudios relacionados con la identificación inequívoca de las moléculas de yodo mediante espectrometría de masas molecular.

Pure Appl. Chem., Vol. 82, No. 2, pp. 473–481, 2010.
doi:10.1351/PAC-CON-09-08-01
© 2010 IUPAC, Publication date (Web): 30 January 2010

Iodine speciation in iodine-enriched microalgae *Chlorella vulgaris**

Veronica Gómez-Jacinto, Ana Arias-Borrego, Tamara García-Barrera,
Ines Garbayo, Carlos Vilchez, and José Luis Gómez-Ariza[‡]

*Department of Chemistry and Materials Science, Experimental Science Faculty,
University of Huelva, El Carmen Campus, 21007-Huelva, Spain*

Abstract: The characterization of iodine species in the microalgae *Chlorella vulgaris* after cultivation with different potassium iodide concentrations was performed using the coupling of multidimensional chromatography (size exclusion chromatography, SEC, and anion exchange chromatography, AEC) with inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) detection. Two iodine fractions, water-soluble and macromolecular fractions, were obtained using a sequential extraction scheme based on chemical reagents. Most iodine species separated from the water-soluble fraction with SEC-ICP-MS (mass range from 0.5 to 100 kDa) are present in inorganic forms (peak III), although the other two peaks were detected (peaks I and II). The application of AEC to the isolated peak III fraction allows the characterization of IO_3^- (about 25 %) and I^- (about 75 %). The application of SEC-ICP-MS (mass range from 10 to 1200 kDa) to the macromolecular fraction reveals the presence of four peaks from the void volume to about 67 kDa, a peak is located about 600 kDa. The mass balance of iodine in the different fractions obtained from the microalgae raw stuff shows that the water-soluble fraction represents 66.7 % of total iodine in microalgae, but the macromolecular fraction only contains 13.3 %, both summing up for 79.9 % of the total amount of iodine, which confirms the suitability of the separation scheme. Further studies have to be focused on the purification of the isolated fractions and their identification by tandem MS.

Keywords: Chlorella; functional foods; iodine speciation; metallomics; microalgae.

INTRODUCTION

Iodine is a critical element for the thyroid hormones behavior, whose presence is necessary to monitor biological and environmental samples. Iodine deficiency in human food or animal feed may lead to organism malfunction, such as rate enhancement, growth and development, carbohydrate metabolism, oxygen consumption, protein synthesis, fetal neurological development, and so on, in which functions iodine is complemented by selenium [1].

In the iodine cycle, several enzymes promote the incorporation of monoiodothyrosine (MIT) and diiodothyrosine (DIT) at the moieties of the protein thyroglobulin, where, depending on their relative position, MIT and DIT produce thyroxine (T_4), triiodothyronine (T_3), and the biologically inactive reverse T_3 (r- T_3), which after proteolysis are leached and triggered into the blood stream. In the plasma the thyroid hormones are transported by proteins and participate in an activation–deactivation mecha-

*Paper based on a presentation at the 3rd International Symposium on Trace Elements in Food (TEF-3), 1–3 April 2009, Rome, Italy. Other presentations are published in this issue, pp. 349–481.

[‡]Corresponding author: E-mail: ariza@uhu.es

nism [2] in which deiodinase, a Se-containing enzyme, transforms the prohormone T_4 into the active hormone T_3 by removing an iodine atom onto the outer ring. Inactivation of thyroid hormones occurs by removal of an iodine atom onto the inner ring of T_4 , which converts T_4 in the r- T_3 , or, alternatively, the active T_3 into the inactive diiodothyronine (T_2).

Iodine concentration in food needs to be controlled, because daily intake of this element recommended for adults ranging from 150 to 200 μg is seldom achieved [3], and iodine deficiency is the primary cause of goiter and can lead to cretinism [4]. The main source of iodine in nutrition is sea fish, milk, and meat, however, the element is added to the feed of cows to enhance milk production, which explains the high levels of this element in milk [5]. In East Asian countries, mainly Japan and China, algae (e.g., *Laminaria*) are used for consumption which can produce iodine overdose and, as a consequence, a high prevalence of goiter and hypothyroidism [6]. The opposite situation generally occurs in inland areas with iodine deficiency, which has resulted in iodine incorporation in table salt (15–25 $\mu\text{g g}^{-1}$) or different dietetic foodstuff [7].

Iodine bioavailability depends on the chemical forms of the element. The content of total iodine, water-soluble and organic non-water-leachable iodine in several macroalgae has been determined [8]. In *Sargassum*, only 40 % of iodine is water-leachable, mainly as inorganic iodide and iodate. The content and distribution of iodine in several biological macromolecules was established. The element is mainly bound to proteins and in minor percentage to polyphenols, pigments, and polysaccharides (algin and fucoidan). Chai et al. [8] have proposed a chemical leaching scheme to isolate iodine-linking proteins, because there are thousands of proteins in seaweed. Acetone was used to leach pigments and then CaCl_2 and caffeine to fix the polysaccharide algin and polyphenols, respectively. Subsequently, treatment with Tris-HCl buffer, SDS (sodium dodecyl sulfate), and NaN_3 was used to break cell walls and protect leachate against bacteria. Finally, proteins were precipitated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, redissolved with water and dialyzed, the resulting extract was lyophilized.

The microalgae *Chlorella vulgaris* has been studied by Burianova et al. [3] for iodine accumulation and latter use as food supplement. There are thousands of microalgae that can be used for this purpose, but *Chlorella* grows very fast and it is easy to monitor the iodine intake process. A chemical scheme has been proposed to separate water-soluble iodine species (iodide and iodate) from organic iodine, protein and volatile iodine compounds. Microalgae can accumulate until 5000 mg of I kg^{-1} , mainly as water-soluble iodine (about 90 %) in the form of iodide.

In the present work, a preliminary study for the characterization of iodine species accumulated by *C. vulgaris* has been performed. The use of multidimensional chromatography (size exclusion chromatography, SEC, and anion exchange chromatography, AEC) with inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) detection has been a powerful tool for this purpose. In addition, the optimization of iodine accumulation in *Chlorella* at laboratory scale was considered. The final aim is to get suitable information for the preparation of iodine functional foods based on this microalga.

EXPERIMENTAL

Standard solutions and reagents

Analytical-grade reagents purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) were used throughout unless specified otherwise. 18 M Ω Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout. The Tris-HCl buffer was prepared by dissolving 30 mM of Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane] in water and adjusting the pH to 7.0 by the addition of hydrochloric acid (1:10, v/v). The buffer solution was degassed in an ultrasonic bath before use.

Instrumentation

Chromatographic separations were carried out using an HP Model 1100 HPLC pump (Hewlett-Packard, Wilmington, DE, USA) as the sample delivery system. Injections were performed using a Model 7725 injection valve with a 50- μ l injection loop (Rheodyne, Cotati, CA, USA). All the connections were made of polyether ether ketone (PEEK) tubing (id 0.17 mm). Analyte species were separated on 10×300 mm \times 13 μ m Superdex-75 and Superdex-200 columns (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) with an exclusion limit of 100 kDa (an effective separation range of 0.5 and 80 kDa) and an exclusion limit of 1300 kDa (an effective separation range of 10 and 600 kDa), respectively [9]. The columns were calibrated (UV detection was used) with the following standards: Gly6 (360 Da), gastrin rat 1 (2126 Da), rabbit liver metallothionein I (7000 Da), ribonuclease A (13 700 Da), chymotrypsinogen A (25 000 Da), bovine albumin (Mr 66 000), and thyroglobulin (Mr 660 000).

Elemental detection was performed using an Agilent 7500c ICP-MS (Agilent, Tokyo, Japan). The HPLC-ICP-MS on-line coupling was performed by connecting the outlet of the chromatograph to the nebulizer inlet of the ICP-MS instrument. A model 5804 R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) was used to accelerate the phase-separation process in the extraction of the compounds.

Sample preparation

Microalgae *C. vulgaris* was kindly provided by the Group of Biochemistry and Biotechnology of Photosynthetic Organisms from the University of Huelva. Standard cultures were performed in a culture room, were grown in mineral liquid medium at 25 °C, bubbled with air containing 5 % (v/v) CO₂, and continuously illuminated with white light from fluorescent lamps (22 W m⁻², at the surface of the flasks). The composition of the culture medium was described previously [10]. Algae were cultivated in the presence of potassium iodide. The cell pellets were lyophilized for later analysis.

Total iodine determination

The analysis of total iodine content was performed on 0.250 g of lyophilized microalgae or extracts by digestion in a microwave-accelerated reaction system, adding 10 ml of ultrapure water and 10 ml of tetramethylammonium hydroxide to a 55-ml microwave Teflon vessel. The poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) vessels were closed and introduced into the microwave oven. The mineralization was carried out at 1000 W from room temperature ramped to 200 °C in 10 min and with holding for 5 min at this temperature [11]. Then, solutions were made up to 25 ml and analyzed by ICP-MS. The method of standard additions was applied for the quantification of the iodine content. Rh was used as the internal standard.

ICP-MS measurement conditions [nebulizer gas flow, radio frequency (RF) power, and lens voltages] were optimized daily using a standard built-in software procedure. An aqueous solution of potassium iodide 10 μ g l⁻¹ was used for sensitivity optimization. Typical examples of the optimum measurement conditions are a nebulizer gas flow of 1.05 l min⁻¹, ICP RF power of 1.1 kW, and a lens voltage of 9 V. The same instrumental conditions were employed when ICP-MS was used as the chromatographic detector.

Speciation of iodine by SEC and ICP-MS

A Superdex 75 column with 100 kDa exclusion limit and 0.5–80 kDa of effective separation range was used for this purpose. A Tris-HCl buffer (pH 7.0) was used as mobile phase at a flow rate of 0.75 ml min⁻¹. A sample aliquot of 50 μ l was injected. The eluate from the column was fed directly into the ICP-MS nebulizer using a PEEK tube of 50 cm. The ¹²⁷I isotope was monitored.

Speciation of inorganic iodine by AEC and ICP-MS

An Agilent 1100 liquid chromatography module equipped with a column (Agilent, Tokyo, Japan) guard column (G3154A/102) and a separation column (G3154A/101) was used for species separation. The inner diameter of the main column was 4.6×150 mm and the guard column was 4.6×10 mm and the column temperature was set at 20°C . A mobile phase composed of $20.0\text{ mM NH}_4\text{NO}_3$ at pH 5.6 was used for the separation of iodate and iodide with a flow rate of 1.0 ml/min . The outlet of the separation column was directly connected to the nebulizer of the ICP-MS unit.

RESULTS AND DISCUSSION

Suitable conditions for the accumulation of iodine in *Chlorella* are strongly depending on iodine concentration in the culture medium. The best experimental conditions for iodine accumulation were obtained for concentrations of $80\ \mu\text{g ml}^{-1}$ of the element in the culture medium as iodide (Fig. 1). For higher concentrations, microalgae grows with difficulty and finally collapses.

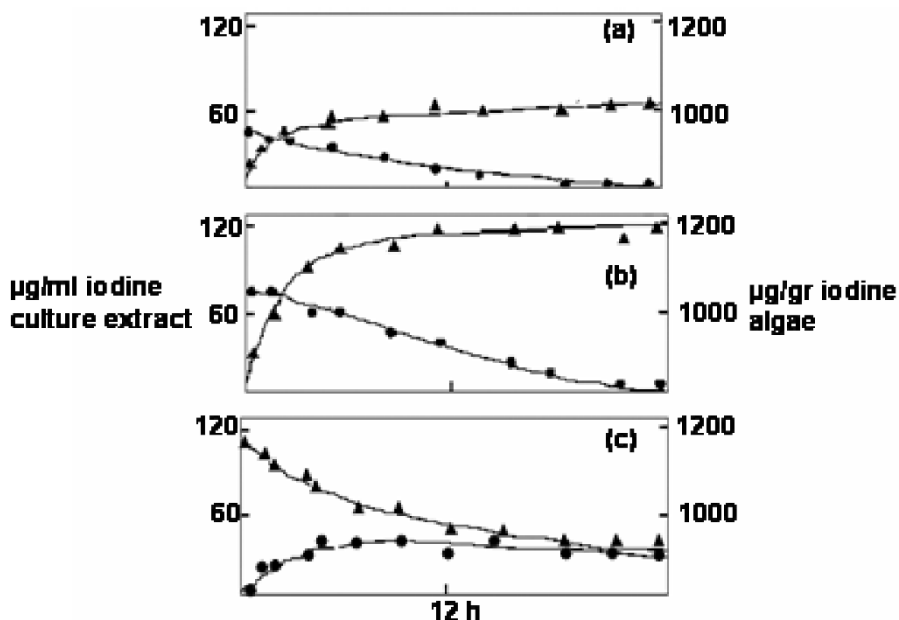


Fig. 1 Accumulation of iodine in the microalgae *C. vulgaris* under different concentration of potassium iodide in the culture. (a) $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$; (b) $80\ \mu\text{g ml}^{-1}$; (c) $120\ \mu\text{g ml}^{-1}$.

Using optimal conditions, the iodine species present in *Chlorella* was studied using a scheme that combines the proposals from Chai [8] and Burianova [3] (Fig. 2). The use of nonaqueous solvents such as acetone or chloroform at the beginning of sequential fractionation was eliminated to avoid potential changes in the iodine molecules that make further identification of molecules by MS difficult. Therefore, water was used for leaching water-soluble molecules. The remaining treatment of residue isolated in step II intends to isolate iodine-linking macromolecules present in the algae. In the water-soluble fraction (II-a), inorganic forms of iodine (iodide from cultivation, iodate from photooxidation of iodide) and water-soluble polar organic compounds (iodized aminoacids, peptides, and eventually water-soluble proteins) are expected. In the water-insoluble fraction (II-b), the presence of organic-bounded iodine species is assumed, especially iodine-binding proteins, which were leached with Tris-HCl buffer (pH 9) containing 0.1 % SDS, and precipitated in saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution. Finally, an iodine-linking protein fraction was achieved by resolubilization in water and purification with dialysis (fraction V-a). Other small fractions separated along the scheme (III-b, IV-b, and V-b) have not been considered in the present study and will be considered in the future.

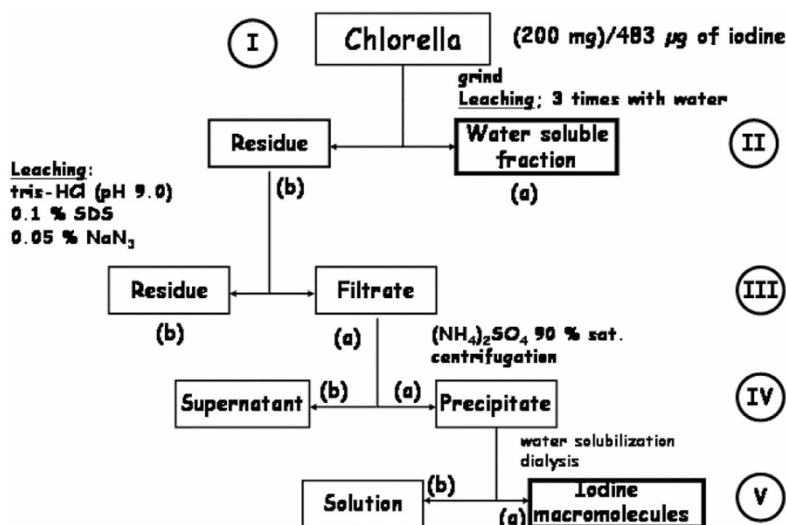


Fig. 2 Scheme for the extraction of iodine water-soluble fraction (II-a) and iodine macromolecular fraction (V-a) from *C. vulgaris*.

Molecular size distribution of aqueous fraction (fraction II-a)

A chromatographic separation based on SEC with ICP-MS detection using a Superdex 75 column with 100 kDa exclusion limit and 0.5–80 kDa of effective separation range was used for this purpose. A Tris-HCl buffer (pH 7.0) was used as mobile phase at a flow rate of 0.75 ml min^{-1} . Detection by ICP-MS allows sensitive identification of iodine-containing molecules. Three peaks were observed (Fig. 3b): peak I, in the exclusion limit, peak II eluted at mass range around 600 Da, and peak III with a retention time similar to iodide in Fig. 3a. This chromatographic system was used to collect peak III that was later submitted to a second chromatographic separation by AEC and ICP-MS detection.

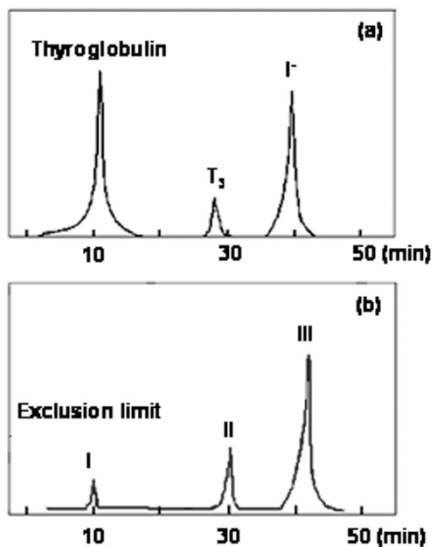


Fig. 3 SEC-ICP-MS chromatogram (Superdex 75 column) of iodine water-soluble fraction. (a) Separation of a mixture of thyroglobulin, T₃ and I⁻, used as standards; (b) separation of microalgae water-soluble extract.

AEC analysis of peak III

AEC study of peak III was performed with NH₄NO₃ (pH 5.6) as mobile phase and ICP-MS as detector [AEC(HPLC)-ICP-MS]. Figure 4 shows the results obtained, only iodide and iodate were detected, with retention times matching with the corresponding standards. Iodide is the most abundant species and represents about 75 % of total iodine in the fraction, iodate accounts for 25 %. Further studies are necessary for fractions I and II of Fig. 3b. Due to the unknown character of these iodine species, identification with MS is necessary; no previous information is provided in the literature about these species, and their identification is a difficult task.

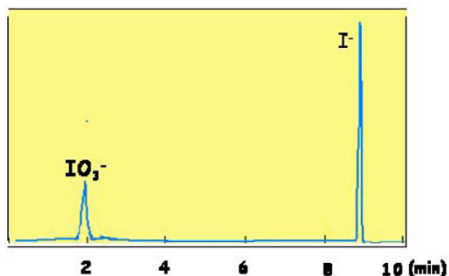


Fig. 4 AEC separation of inorganic iodine (peak III from Fig. 3).

Molecular size distribution of macromolecular fraction

The macromolecular fraction (fraction V-a, in Fig. 3) was submitted to a SEC separation using the Superdex 200 column, with an effective separation range from 10 to 600 kDa and exclusion limit at 1300 kDa. Tris-HCl buffer was used as mobile phase with pH 7.0 and a flow rate of 0.75 ml min^{-1} . The results are shown in Fig. 5. Four peaks can be observed: at the exclusion limit, at about 600, 160, and 60 kDa. However, we do not yet have information about the identity of substances eluted at these retention times, and further studies are necessary to purify these fractions with a second chromatographic orthogonal separation and identification of purified fractions with tandem MS. The metallomics approach proposed for metal-linked biomolecules related to biological functions can be used for this purpose [12–14].

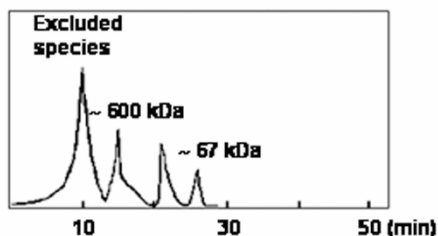


Fig. 5 SEC-ICP-MS chromatogram (Superdex 200 column) of iodine macromolecular fraction.

Mass balance of iodine in the fractions

In order to perform a quality control of the fractionation scheme performed with iodine species extracted from microalgae, a mass balance referred to total iodine amount in the *Chlorella* pellet (fraction I, Fig. 2), water-soluble fraction (fraction II-a) and iodine macromolecule fraction (fraction V-a). For these purposes, aliquots from these fractions were digested and the total amount of iodine measured by ICP-MS. The total amount of iodine, $483 \mu\text{g}$, in microalgae raw stuff used for the study (fraction I), was distributed between fraction II-a, $320.7 \mu\text{g}$, which represents 66.7 %, and fraction V-a which corresponds to 13.3 % of iodine, which sums for 79.9 % of the total amount of this element. About 20 % of remaining iodine was spread among fractions II-b, III-b, IV-b, and V-b (Table 1), which have not been considered in the present study but represent a considerable contribution to total iodine present in microalgae that should be considered in further studies. Total recovery of iodine in isolated fractions II-a, III-b, IV-b, V-a, and V-b reaches about 92.4 %. The two main fractions II-b and V-a, studied in more detail in the present work, account for 79.7 %. These figures confirm the suitability of the separation scheme.

Table 1 Mass balance of iodine in the different fractions.

Fraction	Subfraction	Amount of iodine (μg)	Observations	Recovery (%)
I		483		
II	II-a	320.7	Iodine water-soluble fraction	66.4
	II-b	136.3		
III	III-a	84.3		9.5
	III-b	46.2		
IV	IV-a	70.1		2.2
	IV-b	11.1		
V	V-a	64.3	Iodine macromolecules	13.3
	V-b	4.5		
Total				92.4

CONCLUSIONS

The microalgae *C. vulgaris* can be used for the accumulation when cultured in iodide solution. Two main fractions can be isolated by successive leaching of microalgae stuff with water (water-soluble fraction) and SDS solution (iodine macromolecular fraction). Water-soluble fraction contains 66.4 % of iodine mainly distributed between I^- (75 %) and IO_3^- (25 %), although another small peak reveals the presence of small amounts of other iodine species in this fraction. The iodine macromolecular fraction represents about 13 % of total iodine in the microalgae stuff material and shows several peaks in the SEC-ICP-MS chromatogram, with molecular mass ranging from 60 to 600 kDa, which will be purified, isolated, and identified in further studies based on the use of tandem MS. Although a suitable amount of iodine is accumulated in the algae, additional research can allow optimal iodine enrichment in order to produce functional food suitable for human consumption. In addition, it is necessary to check the metabolism and bioavailability of iodine-based microalgae foods in humans, and establish possibilities for potential use as foodstuff.

The application of ICP-MS as detector of the chromatographic separations represents a valuable tool for characterizing the presence of iodine-linking molecules in cell-based samples as is the case of microalgae *C. vulgaris*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the projects CTM2009-12858-C02-01 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and P008 FQM-3554 and P009-FQM-4659 from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía).

REFERENCES

1. L. Schomburg, J. Köhrle. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 1235 (2008).
2. U. Schweizer, J. M. Weitzel, L. Schomburg. *Mol. Cell. Endocrin.* **289**, 1 (2008).
3. I. Burianová, J. Machát, E. Niedobová, J. Doucha, V. Kanický. *Chem. Listy* **99**, s273 (2005).
4. W. J. Marshall, S. K. Bangert (Eds.). "Thyroid dysfunction", in *Clinical Biochemistry*, p. 331, Churchill Livingstone, New York (1995).
5. M. Anke, B. Groppe, M. Müller, E. Scholz, K. Kramer. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **352**, 97 (1995).

6. N. Konno, H. Makita, K. Yuri, N. Iizuka, K. Kawasaki. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**, 393 (1994).
7. P. A. Fecher, I. Goldmann, A. Nagengast. *J. Anal. At. Spectrom.* **13**, 977 (1998).
8. X. Hou, X. Yan, Ch. Chai. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **245**, 461 (2000).
9. L. Fernandez-Sanchez, J. Szpunar. *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1697 (1999).
10. H. Cao, L. Zhang, A. Melis. *J. Appl. Phycol.* **13**, 25 (2001).
11. V. Romarís-Hortas, A. Moreda-Piñeiro, P. Bermejo-Barrera. *Talanta* **79**, 947 (2009).
12. S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 1119 (2009).
13. M. Dernovics, R. Lobinski. *Anal. Chem.* **80**, 3975 (2008).
14. A. Arias-Borrego, T. Garccía-Barrera, J. L. Gómez-Ariza. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 3053 (2008).

Capítulo 2

Especiación de selenio en la microalga *Chlorella sorokiniana* enriquecida en este elemento en el medio de cultivo

Metallomic study of selenium biomolecules metabolized by the microalgae *Chlorella sorokiniana* in the biotechnological production of functional foods enriched in selenium

(Pure and Applied Chemistry, 2012, 84, 269-280)

Verónica Gómez-Jacinto, Tamara García-Barrera, Inés Garbayo,
Carlos Vilchez and José Luis Gómez-Ariza

Metal-metabolomics of microalgae *Chlorella sorokiniana* growing in selenium-and iodine-enriched media

(Chemical Papers, 2012, 66, 821-828)

Verónica Gómez-Jacinto, Tamara García-Barrera, Inés Garbayo,
Carlos Vilchez and José Luis Gómez-Ariza

Functional foods enriched in Selenium

(En: Victor R Preedy (Ed). Food and Nutritional Components in Focus. Selenium, Chemistry, Analysis, Function and Effects. United Kingdom, Royal Society of Chemistry, 2015)

Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza, Verónica Gómez
Jacinto, Inés Garbayo, Carlos Vilchez and Zivan Gojkovica

El selenio es un elemento esencial para los seres vivos pero cuya presencia muestra un rango muy estrecho entre deficiencia y toxicidad. Las enfermedades asociadas a la deficiencia de selenio, así como los efectos beneficiosos relacionados con un nivel óptimo de este elemento en el plasma, hacen que una ingesta adecuada del mismo sea de gran importancia. El hecho de que el contenido de selenio en el suelo se halle ligado a su concentración en los alimentos, tanto de origen vegetal como animal, hace que existan zonas geográficas deficitarias en el consumo de este nutriente. Los alimentos funcionales enriquecidos en selenio constituyen una buena alternativa para paliar estas carencias.

Algunas microalgas son capaces de acumular grandes cantidades de selenio y transformar sus formas inorgánicas en especies orgánicas nutricionalmente más seguras y bioactivas, como es el caso de *Chlorella sorokiniana*, lo que la convierte a priori en una buena alternativa como alimento funcional.

Estos microorganismos son sensibles a variaciones en su entorno como el pH, temperatura, fuente de carbono o la presencia de otros elementos. Por ello, como paso inicial se evaluó el efecto del selenio sobre el crecimiento de la microalga objeto de estudio. Para ello, se comprobó la influencia de la adición de distintas concentraciones de Se, desde 20 a 500 mg Se L⁻¹ en forma de selenato, en el medio de cultivo. Los resultados mostraron que la presencia de un exceso de selenio en el medio de cultivo de la microalga tiene efecto tóxico, inhibiendo el crecimiento y la producción de la misma. Las condiciones adecuadas para la acumulación de SeMet en el alga se obtuvieron para una exposición a 50 mg Se L⁻¹ en el medio de cultivo.

El porcentaje de Se presente en el medio de cultivo, que se obtuvo tras digestión ácida de la muestra, fue disminuyendo mientras que el contenido en el alga aumentaba.

Para el estudio de la biotransformación del Se en el alga, se realizó un tratamiento de la muestra mediante hidrólisis enzimática con Proteasa XIV, utilizando una sonda de ultrasonidos, determinándose, posteriormente, el Se en los extractos hidrolizados mediante ICP-MS, utilizando cromatografía de fase reversa como mecanismo de separación.

El perfil cromatográfico de selenio, reveló que la especie mayoritaria en el alga es la SeMet. Además, se detectaron otros picos que fueron identificados por tiempo de retención con patrones como SeCys₂, SeMeSeCys y Se(VI). Por otra parte, la quiralidad de la SeMet se evaluó mediante el acoplamiento de una columna quiral después de la de fase reversa. Los resultados indican que la forma L de la especie

SeMet es la que está presente en la microalga. Estos resultados confirman que una vez que el selenato se absorbe por las células, se transforma en L-SeMet, siendo ésta la forma activa de este elemento en *Chlorella*.

Se ha descrito que la entrada de selenio en la célula, en sus formas inorgánicas, especialmente, selenato, se realiza a través de las vías de reducción asimilatoria del sulfato. Por ello, se abordó un estudio en paralelo como estrategia biotecnológica para estimular la incorporación masiva de selenio en carencia de azufre. Los resultados muestran que cuando los cultivos se desarrollan en condiciones de deficiencia de azufre (de 0,4 a 0,1 M), la concentración de selenio en el alga se duplica. Los análisis cromatográficos revelan que la concentración de SeMet aumenta considerablemente, incrementándose también la concentración de Se (VI) en el medio de cultivo, no favoreciéndose la incorporación a selenoaminácidos.

Por otro lado, se ha desarrollado un procedimiento metalómico basado en el uso de una columna de exclusión de tamaño con ICP-MS como detector elemental para el estudio de la presencia en la microalga de biomoléculas unida a Se en los diferentes compartimentos celulares. Para ello, se ha utilizado una extracción secuencial que permite separar los siguientes extractos (i) extracto acuoso, utilizando agua como extractante; (ii) extracción enzimática con Driselasa para extraer los compuestos asociados a la pared celular, (iii) extracción con SDS para separar las selenoproteínas insolubles y (iv) extracción con buffer de fosfato que contiene lipasa y pronasa para liberar y digerir las selenoproteínas residuales.

Los cromatogramas SEC-ICP-MS de Se correspondientes a los diferentes extractos de *Chlorella* muestran varias biomoléculas unidas a Se. Cabe destacar la presencia de un picos de baja intensidad que contienen Se con masa molecular aproximada de 67 kDA, en el extracto liberado con Proteasa. La mayor parte del Se se encuentra formando parte de compuestos de baja masa molecular, como selenoaminácidos.

Los resultados recogidos en este capítulo ponen de manifiesto que la microalga *C. sorokiniana* puede ser utilizada para la bioacumulación de Se biodisponible para su uso como suplemento animal. Debido a la alta concentración de selenio inorgánico en el alga, de relativa toxicidad, se han desarrollado nuevos estudios para la optimización de las condiciones de exposición con objeto de enriquecer el alga en especies bioactivas no tóxicas (SeMet) (Capítulo 5).

Pure Appl. Chem., Vol. 84, No. 2, pp. 269–280, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1351/PAC-CON-11-09-18>
© 2012 IUPAC, Publication date (Web): 17 January 2012

Metallomic study of selenium biomolecules metabolized by the microalgae *Chlorella sorkiniana* in the biotechnological production of functional foods enriched in selenium*

Veronica Gómez-Jacinto^{1,2,3}, Tamara García-Barrera^{1,2,3,‡},
Ines Garbayo^{1,4}, Carlos Vilchez^{1,4}, and Jose Luis Gómez-Ariza^{1,2,3,‡}

¹Department of Chemistry and Material Science, Faculty of Experimental Science, University of Huelva, 21007-Huelva, Spain; ²Campus of Excellence CIA3, University of Huelva, Spain; ³Research Center of Health and Environment (CYSMA), University of Huelva, Spain; ⁴Biotechnology of Algae Group, International Centre for Environmental Research (CIECEM), Parque Dunar S/N, Matalascañas, Almonte, 21760-Huelva, Spain

Abstract: The optimization of culture conditions for selenium (Se) bioaccumulation in the microalgae *Chlorella sorkiniana* growth in a Na₂SeO₄-enriched medium was explored, in order to obtain a suitable approach for the biotechnological production of a Se-enriched food. Se concentration (as Na₂SeO₄) in the culture medium until 100 µg mL⁻¹ allows the growth of algae colonies during long periods of time, until 300 h, but higher concentrations cause the collapse of the colony. The bioaccumulation process causes a concentration of Se in algae in the order of 3 µg g⁻¹ in about 100 h. A metallomic analytical approach based in the coupling high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS), which uses two chromatographic switched columns (C-18 and chiral columns) with ICP-MS detection, has been applied to characterize the different Se metabolites, including chiral forms, in both the algae and culture medium. The results reveal that selenate present in the culture is biotransformed in selenocystine (SeCys₂), selenomethyl-selenocysteine (SeMeSeCys), and mainly selenomethionine (SeMet) by the algae, although appreciable concentration of Se(VI) is also present in cells. When algae are cultured under sulfur (S) deficiency conditions, the accumulation of Se in the cell is enhanced owing to the great chemical similarity between S and Se that promotes the substitution of S by Se in the cell metabolism, therefore, SeMet concentration in the algae increases from about 7 to 15 µg g⁻¹ and Se(VI) from 15 to 25 µg g⁻¹, after 500 h of exposure.

Keywords: chemical speciation; functional food; high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS); liquid chromatography; metallomics; selenium.

Pure Appl. Chem.* **84, 169–333 (2012). A collection of invited papers based on presentations at the 4th International IUPAC Symposium on Trace Elements in Food (TEF-4), Aberdeen, UK, 19–22 June 2011.

‡Corresponding authors: E-mail: ariza@uhu.es; tamara@dqcm.uhu.es

INTRODUCTION

Selenium (Se) is an essential element with important biological functions associated with its antioxidative action, regulation of thyroid hormone metabolism, and cell growth [1]. Se is a key element for important biomolecules such as the enzyme glutathione peroxidase [2] and other selenoenzymes or selenoproteins [3], which are involved in the removal of hydrogen peroxide and lipid peroxides produced during oxidative process in cells. In mammals, Se deficiency has been associated with muscular, neurological, and immune disorders, and also with an increase in cancer incidence [4,5]. In addition, Se deficiency in humans may be related to several diseases such as ischemic heart disease [6], Keshan disease [7], rheumatoid arthritis [8], and others. For this reason, many Se supplements and selenized foods have been proposed to avoid the problems related with the deficiency of this element. One important question is the chemical forms in which Se is ingested, which affects their toxicity, nutritional value, and metabolic fate [9]. The chemical forms of Se depend on the food or supplement considered [10], thus, selenized vegetables such as broccoli, tomato leaves, and cucumbers, accumulate Se as selenite, whereas wheat grain, corn, rice, soybeans, and yeast, predominantly accumulate selenomethionine (SeMet), similarly to some edible mushrooms [11]. However, garlic, onions, and sprouts mainly accumulate Se-methylselenocysteine (SeMeSeCys) and γ -glutamyl-Se-methylselenocysteine [12–14]. Lobinski et al. [15] claimed for a deeper analysis of Se-containing molecules in Se-supplemented foods, using yeast as a model, since only a few molecules of low molecular weight were usually identified but no selenocompounds with molecular masses exceeding 1000 Da, including Se-containing proteins. Nevertheless, the knowledge of virtually all forms of Se present in the supplemented food candidate is also important to fulfill with regulations of governmental agencies issuing sales authorizations [16]. For this reason the development of methods allowing the qualitative and quantitative characterization of the set of Se metabolites is necessary [17] and at the same time is a precious tracer of the origin of the product and the biotechnological process involved [18].

Few studies consider the use of algae as Se bioaccumulator, the microalgae *Spirulina platensis* and its processing products have been employed as feed and food additives in agriculture, food industry, pharmaceuticals, and recently as food supplement [19,20], although it has been constated that Se from Se-rich spirulina was less effective and less bioavailable than Se from sodium selenite and SeMet in repleting GSHPx activity and Se presence in most organs and tissues of Se-depleted rats [20]. Exposure experiments to selenite have been carried out with unicellular marine algae, namely, *Dunaliella primolecta*, *Porphyridium cruetum*, and *Chlorella* sp. [21] in which Se was accumulated in several biochemical components, including proteins, amino acids (*D. primolecta* and *Chlorella* sp.), and lipids (*P. cruetum*), as well as soluble carbohydrates (*D. primolecta* and *Chlorella* sp.). Another study considers the biotransformation of arsenic in the microalgae *Chlorella vulgaris* reveals that major species in a methanol/water (1:1) extract, after exposure to arsenate, is also arsenate (87–100 %), with small amounts of arsenite, dimethylarsinic acid, and three different arsenosugars [22]. The microalgae *C. vulgaris* has been studied by Burianova et al. [23] for iodine (I) accumulation with the purpose to be used as food supplement and a preliminary study for the characterization of I species accumulated by this microalgae has been performed [24]. The algae *C. vulgaris* has been used as model eucaryotic organism to study the bioconcentration and metabolism of Se and other metals; this algae induces the synthesis of phytochelatin in response to Se exposure [25], which has a potential significance if it can increase the storage of dietary Se when the algae is used as dietary supplement. On the other hand, the antagonistic interactions between sulfate and Se in *C. vulgaris* was observed by Shrift [26] in 1954; sulfate and selenate compete for uptake at the sulfate ion transporter(s) [26–28] and also may share the same assimilation pathways [27,29,30]. Under S starvation, algae are more susceptible to Se uptake [31], although the toxic action of Se can also be enhanced.

A study from Stadtman [32] about Se in *C. sorokiniana* reveals that three major amino acids were found in protein hydrolysates: selenocysteic acid, SeMeSeCys, and Se-methylselenocysteine selenoxide. On the other hand, the prevailing fraction of Se analogues in free amino acids and proteins of

C. sorokiniana is a mixture containing selenocysteine (SeCys), selenocystine (SeCys₂), and SeMet. The results suggest that the seleno-aminoacid pattern of algae exposed to sublethal Se concentrations depends on the stage of the algae growth. It has also been established that when exposed to sublethal, but above trace levels of Se, the algal cells tend to substitute Se for sulfur (S). Thus, under overloading conditions, Se appears to use the S enzymatic system, while under normal levels, Se specific enzyme systems seem to be in operation.

The present work considers the optimization of Se bioaccumulation in *C. sorokiniana* from enriched Se media. The characterization of Se species in the algae and culture medium, including organic and inorganic species as well as chiral SeMet forms was performed using a metallomic approach based on high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). Experiments under deficiency of S conditions in the culture medium and studies about change of Se speciation during algae assimilation process were also performed in order to get a biotechnological approach suitable for the production of functional food enriched in Se.

MATERIALS AND METHODS

Instrumentation

Chromatographic separation and detection of Se species has been performed with a HPLC system Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Two columns were connected using a column-switching system comprising two Rheodyne valves model 7725i (Bellefonte, PA, USA): Phenomenex Luna C18 (250 × 4.60 mm, 5 μm, 100 Å pore size) and Astec Chirobiotic T columns (250 × 4.6 mm, 5 μm). The injection volume was 50 μL. The column outlet was directly connected to the nebulizer of the ICP-MS system by PEEK tubing. Elemental detection was performed using an ICP-MS Agilent 7500ce (USA) equipped with a Micromist nebulizer.

An ultrasonic probe (HD 2200, Bandelin electronic, GmbH & Co. Kg, Berli) with a MS 72 tip was used for the extraction of the species. A centrifuge model Sigma Laborzentrifugen 4-10 (Osterode, Germany) was used to accelerate the phase separation process in the extraction of the compounds.

The total chlorophyll and carotenoids was calculated from the absorbance data obtained with a UV-vis spectrometer (Ultraspec 3100 pro, Biochrom Ltd.). The photosynthetic activity was determined by using a Clark electrode (Hansatech, UK). A Neubauer camera and an optical microscope Olympus model CX41 was used to measure the number of cells.

Mineralization of algae samples to determine the total content of Se was performed by using a microwave-accelerated reaction system model MARS (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) and MARSXpress vessels.

Standard solutions and reagents

All reagents used were of highest purity. The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany): KH₂PO₄, Na₂HPO₄·2H₂O, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, KNO₃, EDTA, Na₂EDTA·2H₂O, H₃BO₃, MnCl₂·4H₂O, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, NaHCO₃, DL-selenomethionine (DL-SeMet), L-selenomethionine (L-SeMet), SeMeSeCys, SeCys₂, and Na₂SeO₃ were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Na₂SeO₄ and tetraethylammonium chloride (TEAC) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland).

Aqueous stock standard solutions of 1000 mg Se l⁻¹ were prepared from DL-SeMet and L-SeMet in ultrapure water, Se-MeSeCys, and SeCys₂ in 3 % (v/v) HCl solution, sodium selenate (Na₂SeO₄) in 2 % (v/v) HNO₃ solution, and sodium selenite (Na₂SeO₃) in 2 % (v/v) HCl solution.

Working solutions were prepared daily by stepwise dilution of their stock solutions with high-purity deionized water. Ultrapure water (18 MΩ cm) was obtained from a Milli-Q water-purification

system and was used throughout (Millipore, UK). All the standard solutions were stored at 4 °C in darkness until the analysis.

The chromatographic mobile phase was prepared daily as follows: 0.075 % TEAC aqueous solution at pH 4.5. The pH of mobile phase was adjusted with HCl and NaOH solutions (Merck, Darmstadt, Germany). Protease type XIV was supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

A tuning solution containing Li, Y, Tl, and Ce (1 mg l⁻¹ each) was purchased from Agilent Technologies (USA).

Determination of total selenium

For the determination of total Se in the culture medium, the supernatant obtained from the centrifugation of the cultures was filtrated through a 0.45- μ m filter and an aliquot of 5 ml was digested with 6 ml of HCl (37 % w/v) and 2 ml of HNO₃ (65 % w/v). The samples were digested from room temperature to 165 °C in 10 min and hold for 25 min at this last temperature.

For the determination of Se in *Chlorella*, the pellet obtained from the centrifugation of the culture was lyophilized and an amount of 0.040 g was accurately weighted and submitted to acid digestion with 8 ml of HNO₃ (65 % w/v) and 2 ml of H₂O₂ (30 % w/v). The samples were digested from room temperature to 175 °C in 15 min and hold for 40 min at this last temperature.

The digested solutions were filtered through 0.45 μ m PVDF filters and the elements measured by ICP-MS using the operational conditions shown in Table 1.

Table 1 Operating conditions for ICP-MS.

Forward power	1500 W
Sampling depth	7–8 mm*
Auxiliary gas flow rate	0.10–0.15 ml/min*
Extract 1	0–3 V*
Extract 2	–137.5 V*
Omega Bias-ce	–20 V
Omega Lens-ce	–1.6 V
Cell entrance	–40 V
QP Focus	–15 V
Cell Exit	–44 V
OctP RF	190 V
OctP Bias	–18 V
H ₂ flow	3.8 ml/min
QP Bias	–16 V
Discriminator	8 m V
Analog HV	1840 V

Extraction of selenium species

The culture of *Chlorella* was centrifuged to separate the pellet from the medium. The medium was filtrated using 0.45- μ m filters (PVDF) and then was directly injected into the HPLC-ICP-MS analysis. Liquid nitrogen was applied to the pellet to break the cells wall and an amount of 0.020 g was weighted in a centrifuge tube, then 0.02 g of protease XIV was added. The extraction was performed with the assistance of an ultrasonic probe at 25 % power during 2 min. After the extraction, the sample was centrifuged for 5 min at 6000 rpm and the supernatant collected. Finally, the supernatant was filtered through 0.45 μ m and injected into HPLC-ICP-MS for analysis.

Determination of selenium species

The instrumental approach for the determination of Se species is based on reversed-phase chromatographic separation coupled to ICP-MS detection. The optimal operation conditions for ICP-MS detection are similar to those for the determination of total Se (Table 1). The isotopes ^{77}Se , ^{80}Se , and ^{82}Se were monitored for analysis, but only ^{80}Se was used for quantification. A solution containing Li, Y, Tl, and Ce ($1\ \mu\text{g}\ \text{l}^{-1}$ each) prepared in the mobile phase was used to tune the ICP-MS for sensitivity, resolution, percentage of oxides, and doubly charged ions.

The chromatographic separation was performed on the basis of a previously described instrumental coupling [33]. Briefly, (a) when chiral species are not separated the sample is loaded in the first Rheo valve at the inject position, which allows mobile phase flowing through the C18 column and then entering the second valve that is maintained in the load position, therefore the mobile phase get the ICP-MS detector; (b) when chiral species are separated, the chiral column is activated after SeCys₂ and Se-MeSeCys elution (5 min), changing the valve 2 to the inject position, which allows both columns to work in series, therefore L- and D-SeMet enter the chiral column where they are retained. After 6.7 min, valve 2 is moved again to the load position and Se(VI) elutes from the C18 column. Finally, from 9 to 16 min, the chiral column is again activated allowing L- and D-SeMet separation. The retention times for Se species when the chiral column is not activated are: 3.0 min (SeCys₂), 4.3 min (SeMeSeCys), 7.2 min (SeMet), and 8.3 min [Se(VI)], these values changes when two columns work in series and chiral forms are separated, as follows: 3.0 min (SeCys₂), 4.3 min (SeMeSeCys), 8.1 min [Se(VI)], 13.8 (L-SeMet), 14.8 min (D-SeMet). Se(VI) is allowed to elute before SeMet in the second chromatographic approach to avoid peak broadening. Chromatographic performance was checked regularly by measuring control standards to ensure a suitable separation between species and sensitivity of the method after a considerable number of samples

Preparation of *C. sorokiniana* cultures

Microalgae *C. sorokiniana* CCAP 211/8K was obtained from the UTEX culture collection. It was maintained in modified M-8 medium [34] with $160\ \mu\text{mol}$ of photons $\text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (continuous illumination) at $30\ ^\circ\text{C}$. The culture medium was prepared as follows (composition expressed in $\text{mol}\ \text{l}^{-1}$): KH_2PO_4 , 5.4×10^{-3} ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5×10^{-3} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\ \text{H}_2\text{O}$, 1.6×10^{-3} ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.9×10^{-4} ; KNO_3 , 30×10^{-3} ; EDTA , 0.3×10^{-3} ; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1×10^{-3} ; H_3BO_3 , 1.0×10^{-6} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.7×10^{-4} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1×10^{-4} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.7×10^{-5} ; NaHCO_3 , 5×10^{-3} . The pH was adjusted to 6.7 using NaOH. The sterilization of the medium was carried out during 20 min at $120\ ^\circ\text{C}$. The medium was constantly bubbled with air containing 5 % (v/v) CO_2 for culture homogenization. Cells growth in Roux flasks (5 L) of borosilicate glass Pyrex[®] supervised with the optical microscope to check the culture viability and aseptis. From these cultures, samples were taken for subsequent analysis.

Bioaccumulation experiments on *C. sorokiniana*

Exposure experiments were performed with increasing concentrations of SeO_4^{2-} in the media, from 20 to $500\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$. The concentration of Se in the culture medium was evaluated every day.

Measurement of the biochemical parameters

Algae dry mass was calculated using $0.45\text{-}\mu\text{m}$ filters (cellulose acetate). The filters were cleaned with Milli-Q water and dried at $80\ ^\circ\text{C}$ during 24 h in an oven. Then, 5 ml of the culture was filtered and dried. The dry mass was calculated by weight difference.

The total content of chlorophyll and carotenoids was determined using the Arnon method. 1 ml of the culture was centrifuged during 5 min at 4400 rpm. The supernatant was discarded and 4 ml of

methanol was added to the residue for chlorophyll extraction by shaking during 20 s. The sample was incubated during 30 min at 60 °C and then during 10 min at 0 °C. After that, the sample was centrifuged during 5 min at 4400 rpm obtaining a white pellet. The UV-vis absorbance was measured at 665, 653, and 470 nm. Total content of chlorophyll and carotenoids was calculated using the equations proposed by H. Lichtenthaler [35].

RESULTS AND CONCLUSIONS

Bioaccumulation of selenium in *Chlorella*

Suitable conditions for the accumulation of Se in *Chlorella* are strongly depending on Se concentration in the culture medium. Increasing concentrations of inorganic Se (SeO_4^{2-}) from 20 to 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ were tested in a culture medium containing nutrients such as phosphate, nitrate, and sulfate, and trace elements such as Mn, Zn, Cu, and B. It has been considered the highest concentration of Se (as selenate) in the culture medium that allows longer times of exposure and therefore a high intake of this element. The concentration of chlorophyll is a good marker to evaluate the metabolic status of algae culture and rate of growth. How it can be seen in Fig. 1, algae culture grows acceptably during 100 h for Se concentrations in the medium ranging from 20 to 75 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Fig. 1a). For high concentrations of Se, until 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$, the culture only grows in a suitable manner during 75 h (Fig. 1b) but higher concentrations cause colony collapse. Figure 2 shows the behavior of algae culture by longer periods of time, until 12 days, using concentrations of selenate of 50 and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Both levels of Se in the medium allow successful algae growth during long periods, and a final compromise was adopted for 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ that was used in further experiments.

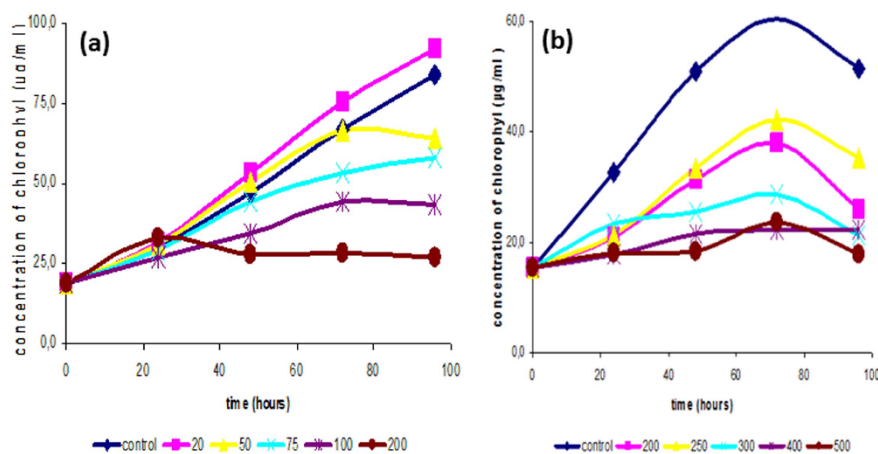


Fig. 1 Algae culture growth in presence of increasing concentrations of Se (SeO_4^{2-}), $\mu\text{g ml}^{-1}$.

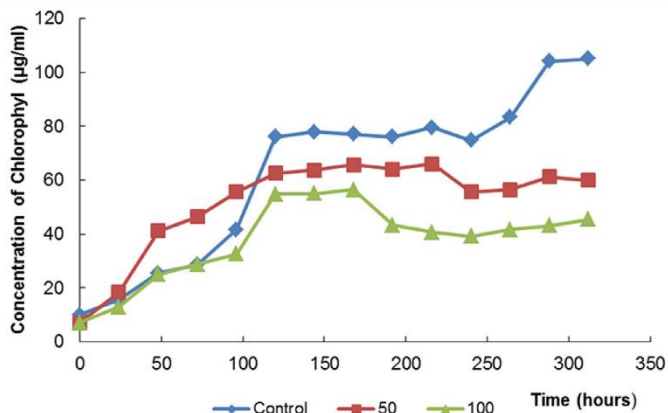


Fig. 2 Algae culture growth for long periods in presence of Se (SeO_4^{2-}), $\mu\text{g ml}^{-1}$.

It can be seen (Fig. 3) how the Se concentration in the culture medium decreases with the time of exposure, increasing correlatively the presence of Se in the cells. A concentration of about $3 \mu\text{g g}^{-1}$ of Se in the pellet was found after 100 h of exposure.

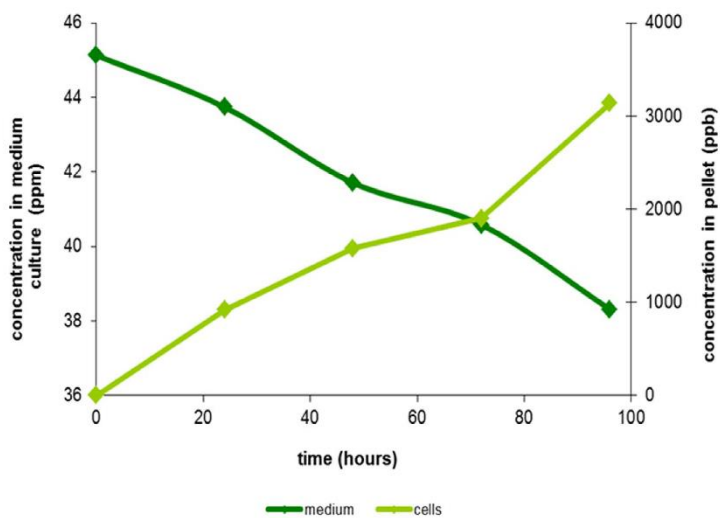


Fig. 3 Se concentration in culture medium and algae cell during a exposure experiment (starting levels of Se in the medium $50 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Presence of selenium metabolites in the algae

A study of Se species in the pellet was performed after extraction with Protease XIV, by using the coupling reversed-phase (RP) HPLC-ICP-MS. As it you can see in Fig. 4, selenate is biotransformed in SeCys₂, SeMeSeCys, and SeMet, mainly in this latter that rise a concentration of about 2.5 μg g⁻¹ in the pellet over 200 h. However, inorganic Se [Se(VI)] is also accumulated in the pellet in a remarkable concentration (about 1.5 μg g⁻¹), which can impair the use of *Chlorella* as food due to the higher toxicity of this specie of Se. Other Se species such as SeCys₂ and SeMeSeCys are also present in the pellet but at lower concentrations (in the order of 500 ng g⁻¹).

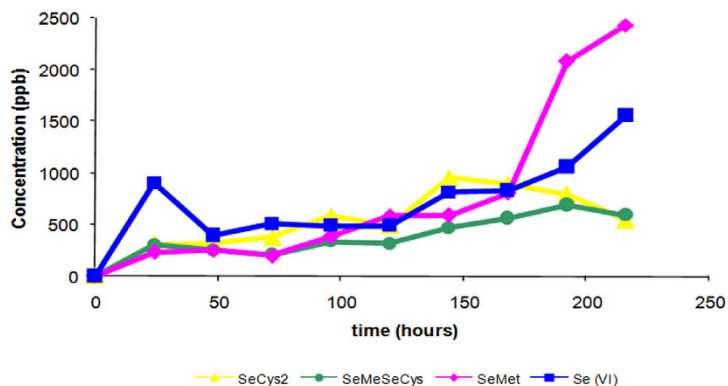


Fig. 4 Bioaccumulation of Se species in *C. sorokiniana* exposed to 50 μg ml⁻¹ in the culture medium.

Algae culture under sulfur-deficiency conditions

The essential character of S is well known for a suitable growth of algae culture. The sulfate ions cross the cell wall to be reduced until sulfide following the typical pathway for sulfur assimilation in algae, which is incorporated into the carbon skeleton of *o*-acetylserine (OAS) to form the S amino acid L-cysteine. This process occurs under control of two enzymatic reactions addressed by serine acetyltransferase (SAT) and *o*-acetylserine(thiol)lyase (OASTL). The OASTL transforms the S in L-cysteine (Fig. 5), however, when Se (SeO₄²⁻) crosses the cell wall it can also participate in the same process producing SeCys₂. Other S and Se compounds such as methionine, SeMet, and glutathione can also be synthesized from the previous species. It has been reported that uptake of selenate in *C. vulgaris* can be performed through a shared high-affinity sulfate ion transporter [27,28]. Expression of the high-affinity sulfate ion transporter genes is regulated by either the availability of sulfate, the demands for reduced S compounds (e.g., glutathione and cysteine), and the supply of precursors needed in the cysteine assimilatory pathway (e.g., OAS) [27,36,38]. Reduced-S compounds regulate this expression in the form of a negative-feedback loop.

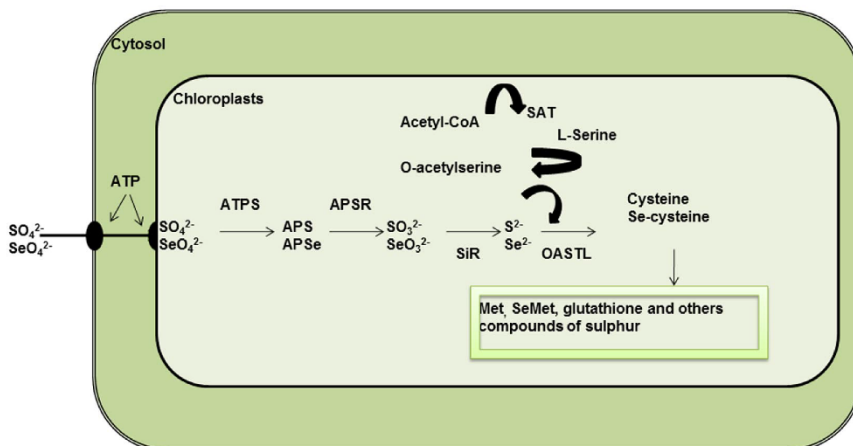


Fig. 5 S/Se metabolism pathway scheme in algae.

Therefore, algae cultured in a S-deficient medium could enhance the accumulation of Se in the cell [38]. In addition, the enzymatic activity of OASTL depends on the level of S or Se in the cell, which can be used as marker of S- or Se-compounds production along the algae metabolism. Figure 6 shows the results of different experiments performed with increasing deficiency of S in a culture medium that maintains a concentration of $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ of Se. It can be seen that OASTL enzymatic activity is retained, although S level in the medium decreases, which assures cell function. However, the algae colony collapses in the total absence of this element.

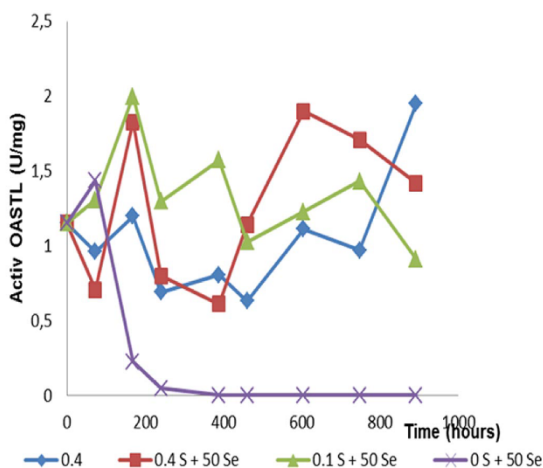


Fig. 6 Enzymatic activity of OASTL in deficiency of S: **0.4S**, culture containing $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ of S; **0.4S + 50Se**, culture with $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ of S and $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ of Se; **0.1S + 50Se**, culture with $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ of S and $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ of Se; **0S + 50Se**, culture in absence of S with $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ of Se.

Figure 7 shows the concentration of Se species in the algae under exposure to conventional (0.4S + 50Se) and S-deficient (0.1S + 50Se) conditions. It can be observed that concentration of SeMet in the algae, after 500 h of exposure, increases from about 7 to 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ when the concentration of sulfur decreases in the culture medium from 0.4 to 0.1 M, although the concentration of Se(VI) also increases and exceeds SeMet.

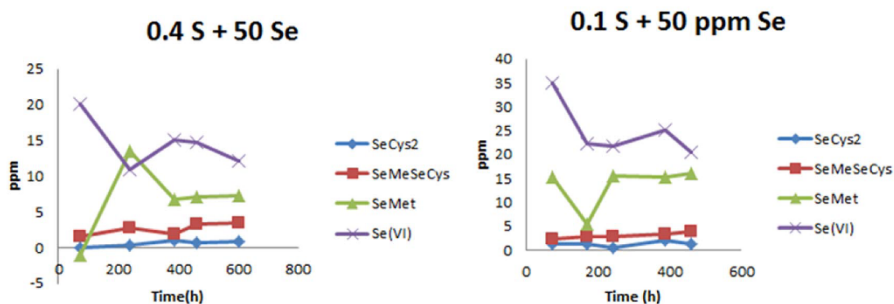


Fig. 7 Concentration of Se species along the time in the algae under Se exposure. **0.4S + 50Se**, culture with 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of S and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of Se; **0.1S + 50Se**, culture with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of S and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of Se.

Changes of selenium speciation during the algae assimilation process

The transformations suffered by Se species were studied in both algae and culture medium during 100 h. The total concentration of Se in the culture solution decreased from 45 to 38 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in this period of time (Fig. 3), remaining as Se(VI), which denotes the absence of traffic of this element from the algae colony to the culture solution. However, both Se(VI) and SeMet were the predominant Se species into the algae, Fig. 4, in which Se is bioaccumulated up to 3 $\mu\text{g g}^{-1}$.

A series of experiments using chiral separation were performed to evaluate the chirality of SeMet in the algae. The resulting chromatogram revealed that SeMet was present as L-SeMet while D-SeMet was practically absent. Therefore, Se(VI) after passing the cell wall is transformed into L-SeMet, which is the active form of this element in *Chlorella*.

CONCLUSIONS

The microalgae *C. sorokiniana* can be used for the bioaccumulation of Se in the production of functional food enriched in this element. The optimization of algae growth conditions to promote Se bioavailable species accumulation from the culture medium has been combined with a metallomic analytical approach to identify and quantify the Se species in which the algae transforms the inorganic Se from the medium. The instrumental coupling is based on a bidimensional chromatographic separation by in series switching of a reversed-phase column (C-18) and a chiral column (Chirobiotic T), which allows the identification of SeCys₂, SeMeSeMet, Se(VI), and L-SeMet in the algae burden, however, no changes were observed in Se speciation in the culture medium that remains as Se(VI) along the study.

Suitable conditions for L-SeMet accumulation in the algae were obtained by exposure to 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of SeO_4^{2-} in the culture medium during 100 h, nevertheless, a remarkable concentration of the more toxic Se(VI) species was also observed in the algae.

Complementary experiments under S-deficient conditions in the culture revealed the enhancement of SeMet concentration in the algae, although the concentration of Se(VI) also increased.

Further studies have to be conducted to develop analytical approaches to identify Se incorporated into proteins (selenoproteoma) by coupling size exclusion chromatography with ICP-MS in combination to mass spectrometry. In addition, tests to assure the algae Se species bioavailability by mammals and finally by humans will be necessary.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the projects CTM2009-12858-C02-01 from the Ministerio de Ciencia e Innovación and P008 FQM-3554 and P009-FQM-4659 from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía). Verónica Gómez-Jacinto thanks the Ministerio de Ciencia e Innovación for a predoctoral scholarship.

REFERENCES

1. S. G. Patching, P. H. E. Gardiner. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **13**, 193 (1999).
2. C.-Y. Liao, Q.-F. Zhou, J.-J. Fu, J.-B. Shi, C.-G. Yuan, G.-B. Jiang. *Environ. Toxicol.* **22**, 69 (2007).
3. R. F. Burk, K. E. Hill. "Regulation of selenoproteins", in: *Annual Review of Nutrition*, 13th ed., R. Olson, D. Bier, D. McCormick (Eds.), pp. 65–81, Annual Reviews, Palo Alto, CA (1993).
4. M. P. Rayman. *Lancet* **356**, 233 (2000).
5. M. P. Rayman. *Proc. Nutr. Soc.* **64**, 527 (2005).
6. N. Ellis, B. Lloyd, B. E. Clayton. *J. Clin. Pathol.* **37**, 200 (1984).
7. Keshan Disease Research Group of the Chinese Academy of Medical Science, Beijing. *Chin. Med. J.* **92**, 477 (1979).
8. U. Tarp, K. Overvad, J. C. Hansen, E. B. Thorling. *Scand. J. Rheumatol.* **14**, 97 (1985).
9. Y. Shiobara, T. Yoshida, K. T. Suzuki. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **152**, 309 (1998).
10. P. D. Whanger. *J. Am. Col. Nutr.* **21**, 223 (2002).
11. Y. Ogra, K. Ishiwata, J. Ruiz Encinar, R. Lobinski, K. T. Suzuki. *Anal. Bioanal. Chem.* **379**, 861 (2004).
12. P. C. Uden, S. M. Bird, M. Kotrebai, P. Nolibos, J. F. Tyson, E. Block, E. Denoyer. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **362**, 447 (1998).
13. C. Ip, M. Birringer, E. Block, M. Kotrebai, J. F. Tyson, P. C. Uden, D. J. Lisk. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2062 (2000).
14. S. McSheehy, W. J. Yang, F. Pannier, J. Szpunar, R. Lobinski, J. Auger, M. Potin-Gautier. *Anal. Chim. Acta* **421**, 147 (2000).
15. J. Ruiz Encinar, L. Ouerdane, W. Buchmann, J. Tortajada, R. Lobinski, J. Szpunar. *Anal. Chem.* **75**, 3765 (2003).
16. European Food Safety Authority. *EFSA J.* **430**, 1 (2006).
17. M. Dernovics, R. Lobinski. *Anal. Chem.* **80**, 3975 (2008).
18. G. N. Schrauzer. *Pure Appl. Chem.* **78**, 105 (2006).
19. J. Cases, V. Vacchina, A. Napolitano, B. Caporiccio, P. Besançon, R. Lobinski, J. M. Rouanet. *J. Nutr.* **131**, 2343 (2001).
20. J. Cases, I. A. Wysocka, B. Caporiccio, N. Jouy, P. Besançon, J. Szpunar, J. Rouanet. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3867 (2002).
21. N. R. Bottino, C. H. Banks, K. J. Irgolic, P. Micks, A. E. Wheeler, R. A. Zingaro. *Phytochemistry* **23**, 2445 (1984).
22. L. A. Murray, A. Raab, I. L. Marr, J. Feldmann. *Appl. Organometal. Chem.* **17**, 669 (2003).
23. I. Burianová, J. Machát, E. Niedobová, J. Doucha, V. Kanický. *Chem. Listy* **99**, s273 (2005).
24. V. Gómez-Jacinto, A. Arias-Borrego, T. García-Barrera, I. Garbayo, C. Vilchez, J. L. Gómez-Ariza. *Pure Appl. Chem.* **82**, 473 (2010).

25. D. B. D. Simmons, R. J. Neil Emery. *Environ. Toxicol. Chem.* **302**, 469 (2011).
26. A. Shrift. *Am. J. Bot.* **41**, 223 (1954).
27. N. Terry, A. M. Zayed, M. P. De Souza, A. S. Tarun. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 401 (2000).
28. M. Williams, R. S. Ogle, A. W. Knight, R. G. Burau. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **27**, 449 (1994).
29. H. E. Ganther, J. R. Lawrence. *Tetrahedron* **53**, 12299 (1997).
30. C. Ip, Y. Dong, H. E. Ganther. *Cancer Metastasis Rev.* **21**, 281 (2002).
31. D. Umysová, M. Vítová, I. Dousková, K. Bisová, M. Hlavová, M. Cízková, J. Machát, J. Doucha, V. Zachleder. *BMC Plant Biol.* **9**, 1471 (2009).
32. T. C. Stadtman. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 93 (1980).
33. F. Moreno-Roldan, T. García-Barrera, J. L. Gómez-Ariza. *Analyst* **135**, 2700 (2010).
34. R. K. Mandalam, B. Palsson. *Biotechnol. Bioeng.* **59**, 605 (1998).
35. H. Lichtenthaler. *Methods Enzymol.* **148**, 350 (1987).
36. D. Mendoza-Cózatl, H. Loza-Tavera, A. Hernandez-Navarro, R. Moreno-Sanchez. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 653 (2005).
37. F. Smith, A. Rae, M. Hawkesford. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 236 (2000).
38. D. Umysová, M. Vítová, I. Dousková, K. Bisová, M. Hlavová, M. Cízková, J. Machát, J. Doucha, V. Zachleder. *BMC Plant Biol.* **9**, 1 (2009).

Capítulo 2

El artículo “*Metal-metabolomics of microalgae Chlorella sorokiniana growing in selenium-and iodine-enriched media*” y el capítulo de libro “*Functional foods enriched in Selenium*” que forman parte del Capítulo 2 han sido retirado de la tesis debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Dichas publicaciones han sido sustituidas por su referencia bibliográfica, así como por el enlace al texto completo (solo miembros de la UHU) si lo tuviera, enlace a la revista y resumen.

- Gómez Jacinto, V., García Barrera, T., Garbayo Nores, I., Vílchez Lobato, C., Gómez Ariza, J.L.: “*Metal-metabolomics of microalgae Chlorella sorokiniana growing in selenium-and iodine-enriched media*”. Chemical Papers. Vol. 66, n. 9, págs.. 821-828 (2012). DOI: 10.2478/s11696-012-0186-7

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU)

<http://dx.doi.org/10.2478/s11696-012-0186-7>

Enlace a la publicación:

<http://link.springer.com/article/10.2478%2Fs11696-012-0186-7>

RESUMEN:

The microalga *Chlorella sorokiniana* has been used to accumulate selenium and iodine from culture media enriched with these elements as a first stage in the production of supplemented foods. The microalgal colony was grown in a conventional culture medium containing iodine (KI) at concentrations in the range of 150–4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Similar experiments were performed with selenium (SeO_4^{2-}) at concentrations in the range of 20–500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The concentration of iodine and selenium in the culture medium was analytically monitored daily and the viability of the colony was checked by biomass concentration measurement and by evaluation of the total content of chlorophyll and carotenoids. In addition, photosynthetic activity and the number of cells were also monitored. Iodine accumulation in the algal biomass increased rapidly with time and reached a steady state after 4 h of exposure. With Se exposure the colony viability decreased, although the culture grew well with concentrations of the element of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in the culture medium; this experiment produced Se-enrichment in the alga (3 $\mu\text{g g}^{-1}$) within 100 h. Sequential extraction of an algal pellet was performed in order to separate Se compounds according to their affinity with the following solvents: hot water to recover low molecular mass Se species, enzymatic extraction with driselase for species associated with the cell wall, sodium dodecyl sulphate (SDS) for water insoluble selenoproteins and, finally, enzymolysis with lipase and pronase that release and fragment residual selenoproteins producing compounds with low molecular mass. Size-exclusion chromatography (SEC) coupled with an ICP-MS detector showed the preponderance of Se-containing molecules with low molecular mass, possibly seleno-amino acids. Only a peak of low intensity located at 10 min was

observed in the SDS extract that could be associated with a protein with molecular mass of 67 kDa. Finally, analysis of the aqueous extract of alga by reverse-phase chromatography with inductively-coupled plasma mass-spectrometry (RPC-ICP-MS) detection revealed the presence of selenocysteine (SeCys₂), selenomethylselenocysteine (SeMetSeCys), selenomethionine (SeMet), and Se(VI), particularly the last two species.

- García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L., Gómez Jacinto, V., Garbayo Nores, I., Vílchez Lobato, C., Gojkovic, Z. "*Functional foods enriched in Selenium*". En: Selenium : chemistry, analysis, function and effects. Londres : Royal Society of Chemistry, 2015. DOI: 10.1039/9781782622215-00273

Enlace a la publicación:

<http://pubs.rsc.org/en/Content/Chapter/9781782622215-00273/978-1-78262-221-5#!divabstract>

RESUMEN:

Nowadays functional foods are a challenge in the therapy of different pathologies. Selenium-containing foods can also be considered as functional foods due to the health benefits of this element, which can be supplemented to humans by multivitamins and multimineral preparations containing inorganic Se and *Saccharomyces cerevisiae* yeast, which contains mainly selenomethionine. However, other selenium-rich supplements can be proposed, such as microalgae, due to the high iodine- and selenium-accumulation capacity. On the other hand, selenium supplementation in products for human nutrition has to be done with caution, having in mind the duality of selenium action in human organism and the narrow range between both toxic and essential levels. This chapter discusses the main aspects related to selenium-enriched functional foods with a focus on the typical concentrations and chemical forms of selenium in foods and food supplements, the nutritional and toxicological aspects of this element, the interaction with mercury and iodine and its bioavailability, bioaccessibility and bioactivity in food.

Capítulo 3

Estudio de la respuesta biológica de la microalga *Chlorella sorokiniana* a la exposición de mercurio inorgánico.

Elucidation of defense mechanism in microalgae *Chlorella sorokiniana* under mercury exposure. Identification of Hg-phytochelatins

(Chemico-Biological Interactions, 2015, 238, 82-90)

Verónica Gómez-Jacinto, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza, Inés Garbayo and Carlos Vilchez

Metalloomics and Metabolomics of Plants under Environmental Stress Caused by Metals

(En: D.K. Gupta et al. (Ed). Heavy Metal Stress in Plants. Metalloomics and Metabolomics of Plants under Environmental Stress Caused by Metal. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013)

José Luis Gómez-Ariza, Tamara García-Barrera, Miguel Ángel García Sevillano, Macarena González-Fernández and Verónica Gómez Jacinto

La contaminación constituye la base de importantes problemas medioambientales, representando una amenaza para la salud y el bienestar de personas y ecosistemas. El desarrollo de procedimientos analíticos para el estudio de la biodisponibilidad y el impacto medioambiental de los metales en los organismos vivos ofrece un desafío permanente tanto para la química analítica medioambiental como para la toxicología clínica. Algas y microalgas son capaces de acumular metales pesados en concentraciones de varios órdenes de magnitud en relación al medio donde viven y se desarrollan, y pueden defenderse de su efecto tóxico mediante mecanismos similares a las plantas superiores, como la formación de complejos con fitoquelatinas. Como se ha comentado en la introducción, la microalga *Chlorella* se ha utilizado en esta capítulo como organismo modelo para el estudio del efecto tóxico causado por el Hg en organismos vegetales.

La metalómica constituye una buena alternativa para el estudio de biomoléculas unidas a metales en organismos vivos, mediante el uso de sistemas cromatográficos multidimensionales acoplados a sistemas de detección elemental, generalmente ICP-MS, utilizado en paralelo equipos para la caracterización molecular, como el ESI-MS, que permite el establecimiento de la estructura molecular.

En el trabajo que da soporte a este capítulo se ha desarrollado un procedimiento metalómico basado en el uso de un sistema cromatográfico bidimensional, SEC seguido de fase reversa, combinado con un doble sistema de detección; ICP-MS como detector elemental y ESI-qTOF-MS como detector molecular. Esta plataforma instrumental se ha optimizado para el estudio de fitoquelatinas de Hg en células de *Chlorella* expuestas a dicho elemento. Dicha experiencia se llevó a cabo mediante adición de cloruro de Hg al medio de cultivo.

La microalga *Chlorella sorokiniana* ha mostrado una gran tolerancia a Hg. La concentración subletal después de 9 días de exposición fue de 5 mg·L⁻¹. Por lo tanto, *C. sorokiniana* se encuentra entre las especies más tolerantes a Hg inorgánico. La exposición de la microalga provocó una reducción en densidad celular, y reducción de la producción de biomasa así como de la concentración de clorofila.

Una vez preparados los extractos citosólicos del alga expuesta y del cultivo control, se estudiaron mediante SEC-ICP-MS para obtener los perfiles metal-biomolécula, usando una columna analítica SuperdexTM75 (3-70 kDa).

Los cromatogramas SEC-ICP-MS de Cu correspondientes a los extractos de *Chlorella* muestran varias biomoléculas unidas a Cu dentro del rango molecular entre 3-70 kDa. Cabe destacar la presencia de dos picos que contienen biomoléculas de Cu con masas moleculares aproximadas de 14 kDa y 7 kDa, coincidiendo con los tiempos de retención de los patrones de mioglobina y metalotioneína, respectivamente, observándose un incremento de un 60% en la señal del primer pico en los cultivos expuestos a Hg.

El uso de la columna Superdex-Peptide, permitió mejorar la resolución e intensidad de los picos de bajo peso molecular. Los cromatogramas SEC-ICP-MS con esta columna revelan la presencia de biomoléculas que contienen Hg. Dos picos con masas moleculares aproximadas a 500 kDa y 1 kDa, pueden ser atribuidos a compuestos Hg-GSH y fitoquelatinas, debido a la afinidad del Hg por estas biomoléculas. El perfil del Hg también muestra un pico de masa molecular aproximada de 7 kDa.

Con objeto de identificar y confirmar que las posibles moléculas presentes son fitoquelatinas, el extracto celular del cultivo expuesto a Hg se ultrafiltró con filtros de corte de 3 kDa. La fracción correspondiente a las masas moleculares menores se sometió a una nueva separación cromatográfica usando fase reversa, con columna Pherisorb ODS2. El uso combinado de esta segunda separación cromatográfica RP-HPLC-ICP-MS y el uso en paralelo del acoplamiento RP-HPLC-ESI-QqQ-TOF-MS permitió la identificación de dos fitoquelatinas de Hg de masa m/z 683, (Gly)PC₂Hg, y m/z 740, PC₂Hg. La identificación de los compuestos fueron confirmados mediante experiencias de fragmentación MS/MS.

Todos estos resultados proporcionan información sobre la respuesta biológica de la microalga *Chlorella sorokiniana* a la presencia de Hg, utilizada como modelo de organismo unicelular, a la toxicidad inducida por este elemento. La síntesis de fitoquelatinas es un mecanismo de defensa efectiva en la respuesta a Hg a concentraciones subletales del metal. El procedimiento metalómico desarrollado en este trabajo constituye una herramienta útil para la elucidación del mecanismo de defensa del alga bajo exposición a Hg, haciendo posible la identificación inequívoca de metalo-biomoléculas, como es el caso de las dos fitoquelatinas.

Capítulo 3

El artículo “*Elucidation of defense mechanism in microalgae Chlorella sorokiniana under mercury exposure. Identification of Hgphytochelatins*” y el capítulo de libro “*Metallomics and Metabolomics of Plants under Environmental Stress Caused by Metals*” que forman parte del Capítulo 3 han sido retirado de la tesis debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Dichas publicaciones han sido sustituidas por su referencia bibliográfica, así como por el enlace al texto completo (solo miembros de la UHU) si lo tuviera, enlace a la revista y resumen.

- Gómez Jacinto, V., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L., Garbayo Nores, I., Vílchez Lobato, C.: “*Elucidation of defense mechanism in microalgae Chlorella sorokiniana under mercury exposure. Identification of Hgphytochelatins*”. *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 238, págs. 82–90 (2015). DOI: 10.1016/j.cbi.2015.06.013

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.06.013>

RESUMEN:

Algae and aquatic macrophytes are capable of accumulating heavy metals up to concentrations several orders of magnitude higher than those existing in their surrounding environment. Investigation of mercury toxicology in microalgae is of great interest from ecological point of view, since they could be used as bioindicator to evaluate aquatic ecosystems affected by Hg pollution. In this study, we have performed an exposure experiment focused on the biological response of microalgae *Chlorella sorokiniana*, a unicellular model organism, to Hg-induced toxicity. The culture was exposed to different concentrations of this element for nine days, namely 0.5, 1, 5 and 10 mg L⁻¹ of HgCl₂ (as Hg). To achieve a better understanding of the biological mechanisms triggered by Hg-induced toxicity in this alga a metallomic approach based on SEC–ICP–ORS–MS was applied to survey biomarkers of biological response to mercury contamination in surface water. In addition, the combination of RP–HPLC–ICP–ORS–MS and RP–HPLC–ESI–QQ–TOF–MS was applied to identify, for the first time, two Hg-binding phytochelatins in this aquatic organism, using cell extracts from microalgae exposed to inorganic mercury.

- Gómez Ariza, J.L., García Barrera, T., García Sevillano, M.A., González Fernández, M., Gómez Jacinto, V. "*Metallomics and Metabolomics of Plants under Environmental Stress Caused by Metals*". En: Dharmendra K. Gupta, Francisco J. Corpas, José M. Palma (eds.). *Heavy Metal Stress in Plants*. Berlin : Springer, 2013. DOI: 10.1007/978-3-642-38469-1_10

Enlace a la publicación:

http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-38469-1_10

RESUMEN:

The role of metals in living organisms is considered on the basis of abundance of metalloproteins and metallometabolites and the occurrence of environmental hazards caused by metals lixiviation and mobility from soils, industrial and mining wastes, which contribute to plant uptake, and can finally get to man from seed and vegetal foods. Intake by plants of toxic metals such as mercury, arsenic, and cadmium, and the transformation that suffers in the organism, as well as the alteration of metabolism represents a valuable appraisal of organism's behavior under the presence of deleterious metals as well as their traffic along the components of cell and tissues, and the interaction with essential elements. Recent analytical approaches to obtain massive information from complex living organisms, such as metallomics to characterize the entirety metal biomolecules in an organism (metallome) and metabolomics to decipher the whole molecules with mass less than 1,000 Da, are the new generation of analytical techniques for assessment plant and other organisms' metal stress, as well as the study of metal pollution remediation driven by plants (hyperaccumulators), preparation of plant-based essential enriched food, and other useful applications. Metallomics techniques are based on hyphenated analytical units combining chromatographic components, high sensitivity element detectors (mainly ICP-MS) for metal species detection, and tandem mass spectrometry for chemical species identification, integrating a three-dimensional analytical platform. Metabolomics mainly uses high resolution mass spectrometry as QqQ-TOF-MS or Orbitrap. Therefore, Integration of these omics provides results with high-added value representing a new angle to study overall response of plants under the action of metals. A great variety of examples can be pointed out in relation to plant exposure experiments to metals, use of plant as bioindicator for environmental monitoring of metal pollution, preparation of essential elements of functional foods based on microalgae under biotechnological production, behavior of heavy metal hyperaccumulator plants, and many other cases.

Capítulo 4

Estudio del efecto protector de la selenometionina sobre la toxicidad inducida por metilmercurio en *Chlorella sorokiniana*.

Antagonistic interaction of selenomethionine enantiomers on methylmercury toxicity in the microalgae *Chlorella sorokiniana*

(Metallomics, 2014, 6, 347-355)

Fernando Moreno, Tamara García-Barrera, Verónica Gómez-Jacinto,
José Luis Gómez-Ariza, Inés Garbayo and Carlos Vilchez

Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species.

(Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 203, 2237-2253)

Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza, Macarena González-Fernández, Fernando Moreno, Miguel Ángel García-Sevillano, Verónica Gómez-Jacinto

Debido a que los seres vivos están expuestos a un medio ambiente complejo en el cual los diferentes elementos y sus especies están presentes conjuntamente, dichas interacciones hacen imprescindible el desarrollo de métodos analíticos que permitan la especiación simultánea de los elementos, considerando los efectos sinérgicos y antagonistas entre ellos, que además está vinculado al metabolismo de los organismos en estudio.

Es bien conocido que las formas químicas del Se afectan a la toxicología del mercurio. Aunque la especie SeMet es la que más contribuye a la detoxificación del MeHg, poco se dispone de datos sobre la influencia de la quiralidad de la SeMet en estos procesos. El efecto protector del Se sobre la toxicidad del mercurio depende además de las relaciones molares entre ellos.

En este capítulo, la microalga *C. sorokiniana* ha sido expuesta a la presencia de MeHg⁺ en el medio de cultivo y a la acción protectora de los enantiómeros de SeMet, empleando un procedimiento analítico que permite la separación simultánea de varias especies de Se y Hg, incluidos los enantiómeros de SeMet, mediante HPLC-ICP-MS, utilizando una columna quiral.

Dicha experiencia se llevó a cabo mediante adición de MeHg⁺ al medio de cultivo, comprobándose inicialmente la concentración subletal de esta forma química del Hg, que se estableció en 400 µg·L⁻¹ de Hg en el medio. Las especies de Se y Hg se separaron a partir de los extractos citosólicos mediante un acoplamiento de columnas cromatográficas (column switching) diseñado en nuestro laboratorio mediante el uso de dos válvulas Rheodyne y dos columnas: Phenomenex Luna C18 y Astec Chiriobitic T.

Los resultados obtenidos, indican una mejora de los parámetros bioquímicos en los cultivos pretratados con SeMet antes de la exposición a MeHg⁺ respecto a los expuestos sólo a MeHg⁺, comprobándose que los niveles de MeHg⁺ en las células son inferiores en los cultivos pretratados con SeMet, lo cual indica que la incorporación de MeHg⁺ en las células se reduce considerablemente en presencia de SeMet o que la eliminación de esta especie aumenta.

Esta experiencia permitió observar la elevada capacidad del MeHg⁺ para atravesar las membranas celulares, ya que el compuesto va desapareciendo del medio de cultivo, durante el transcurso del experimento. Por otro lado, el procedimiento de especiación quiral

puesto a punto permitió comprobar que la especie D-SeMet no participa en el proceso de protección/desintoxicación del MeHg⁺ ya que es asimilada por el alga y transformada en otros metabolitos, no encontrándose ni en el alga ni el medio de cultivo. La SeMet da origen a otras especies de Se en el interior de la célula como SeCys y SeMeSec. El aumento de la concentración de SeMeSeCys en las células expuestas a D-SeMet frente a la menor presencia en las expuestas a L-SeMet, parece indicar la conversión de D-SeMet en SeMeSeCys. La D-SeMet puede también transformarse en L-SeMet, ya que ésta está también presente en los cultivos sólo expuestos a D-SeMet. Sin embargo, la D-SeMet no se encuentra cuando progresan estas experiencias debido a las transformaciones indicadas. No obstante, ya que la suma de las diferentes especies identificadas representa el 77 % del total de Se, puede pensarse, en base a los estudios realizados por otros autores, que se forme un complejo Se-Hg indetectable con la metodología analítica utilizada.

Todos estos resultados proporcionan información valiosa sobre los mecanismos de interacción entre las especies de Hg y Se en la microalga *Chlorella sorokiniana*, permitiendo establecer como hipótesis que la especie protectora activa es el enantiómero L de la SeMet. El ICP-MS permite obtener perfiles multielementales en un solo análisis, lo cual es fundamental en estudios que implican el uso de muestras biológicas. El carácter multielemental de este detector es muy importante para evitar errores en los tiempos de retención de los diferentes elementos asociados a diferentes medidas, lo que permite comparar estos perfiles sin posibilidad de error.

El procedimiento analítico desarrollado en este trabajo constituye una herramienta útil para la extracción y análisis de las especies de ambos elementos de forma simultánea, en un único método que permite la extracción conjunta de las especies de selenio y mercurio y la determinación simultánea de las especies extraídas mediante acoplamiento HPLC-ICP-MS.

La segunda parte de este capítulo está dedicada al estudio de las interacciones de los elementos más ampliamente estudiados en este contexto (Se, Hg y As), así como otras interacciones importantes entre diferentes elementos y la metodología empleada para ello.

Capítulo 4

Los artículos “*Antagonistic interaction of selenomethionine enantiomers on methylmercury toxicity in the microalgae Chlorella sorokiniana*” y “*Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species*” que forman parte del Capítulo 4 han sido retirado de la tesis debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Dichas publicaciones han sido sustituidas por su referencia bibliográfica, así como por el enlace al texto completo (solo miembros de la UHU) si lo tuviera, enlace a la revista y resumen.

- Moreno, F., García Barrera, T., Gómez Jacinto, V., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L., Garbayo Nores, I., Vílchez Lobato, C.: “*Antagonistic interaction of selenomethionine enantiomers on methylmercury toxicity in the microalgae Chlorella sorokiniana*”. *Metallomics*. Vol. 6, págs. 6, 347-355 (2014). DOI: 10.1039/C3MT00296A

Enlace a la publicación:

<http://dx.doi.org/10.1039/C3MT00296A>

RESUMEN:

The protective effect of selenium against mercury toxicity is well known especially between selenomethionine and methylmercury and it has been studied in several living organisms, however information is lacking about the interaction of these species in *Chlorella*. Investigation into which chiral form of selenomethionine effectively acts against the toxic effects of methylmercury has not previously been carried out. In the present work, two control cultures and two cultures of *C. sorokiniana* were grown in standard medium with D,L-SeMet, L-SeMet or D-SeMet. After the experiment was started up MeHg⁺ was added periodically to the cultures containing D,L-SeMet, L-SeMet, D-SeMet and to one of the control batches. The results show that both SeMet enantiomers counteract the toxicity of MeHg⁺, by markedly increasing the total content of chlorophyll, carotenoids, as well as the dry weight and light dependent oxygen production, compared to the culture which is non pre-treated with SeMet and is only exposed to MeHg⁺. The levels of MeHg⁺ measured in cells are lower in the cultures pre-treated with SeMet indicating that the passage of MeHg⁺ into the cells is negligible when carried out in the presence of SeMet, or that SeMet enhances the release of MeHg⁺. On the other hand, L-SeMet is directly involved in the detoxification of MeHg⁺, but the involvement of D-SeMet occurs only indirectly since it has been neither identified in the medium nor in *C. sorokiniana* after supplementation with this enantiomer. It may be that D-SeMet is transformed into SeMeSec and L-SeMet. Moreover, SeMeSec is almost totally released from the cells after 72 hours. No mercury–selenium complex was detected but, since the summation of the different species identified accounted only for 77% of the total selenium and mercury measured directly after sample digestion, it is possible that they are present in the form of an undetected Se–Hg complex. This hypothesis is supported by the decrease of inorganic selenium during the experiment. The present paper reports new data about the relationship between the mechanism of detoxification of methylmercury and selenomethionine enantiomers through the study of the metabolic intermediates by means of speciation analysis.

- García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L., González Fernández, M., Moreno, F., García Sevillano, M.A., Gómez Jacinto, V.: *“Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species”*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 403, págs. 2237-2253, (2012). DOI: 10.1007/s00216-012-5776-2

Enlace al texto completo (solo para miembros de la UHU)

<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-012-5776-2>

RESUMEN:

The fact that the essential or toxic character of elements is species specific has encouraged the development of analytical strategies for chemical speciation over the last twenty years; indeed, there are now a great number of them that provide very good performance. However, biological systems are exposed to a complex environment in which species of elements can interact in a synergistic/antagonistic fashion. Thus, the metabolism of trace elements cannot be considered in isolation. On the other hand, biological systems are dynamic, so it is necessary to study the trafficking of species of elements between organs, tissues or cell compartments in order to decipher the biochemical processes of the interactions in which they are involved. Although the application of liquid chromatography–inductively coupled plasma-based “metallomics” methods in combination with organic mass spectrometry can provide much-needed insight, new analytical strategies are required to really understand the role of species of elements in biological systems and the mechanisms of their interactions. In the present paper, the interactions of the most widely studied elements in this context (Se, Hg and As) are discussed, as well as other important interactions between different elements.

Capítulo 5

Estudio de la biodisponibilidad “in vitro” del Se en la microalga *C. sorokiniana* enriquecida en Se. Estudio metalómico y metabolómico “in vivo” en ratones alimentados con la microalga *C. sorokiniana* enriquecida en Se.

***In vitro* selenium bioaccessibility from Se-enriched microalgae
*Chlorella sorokiniana***

(Food Chemistry, enviado)

Verónica Gómez-Jacinto, Tamara García-Barrera, José Luis Gómez-Ariza, Inés Garbayo-Nores and Carlos Vilchez-Lobato

Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species.

(Food Chemistry, enviado)

Verónica Gómez-Jacinto, Tamara García-Barrera, Francisco Navarro-Roldán, Zaida Montero-Roldán and José Luis Gómez-Ariza

Si bien la determinación del Se total y sus especies en los alimentos proporciona una información muy útil en el campo alimentario, no es suficiente para estimar la eficacia nutricional de los alimentos enriquecidos en Se, siendo necesario evaluar también su contenido en la fracción bioaccesible. Hasta el momento no hay información acerca del contenido e identidad de los compuestos de Se solubles tras la digestión gastrointestinal de algas enriquecidas en Se, que proporciona una buena estimación de su bioaccesibilidad. La biodisponibilidad va a depender de la digestión, absorción, transporte y biotransformación de Se en formas biológicamente activas. Una manera sencilla de llevar a cabo estos estudios es aplicando un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*.

Establecidas las condiciones para la acumulación de Se compatible con la viabilidad de los cultivos y determinada y cuantificada la presencia de selenoaminoácidos en cultivos de las microalgas en condiciones estándar (Capítulo 2), se ha conseguido estimular la acumulación de Se en la forma química bioactiva SeMet, tras la adición del Se en la forma de selenato sódico una vez que la microalga ha alcanzado su fase de crecimiento exponencial. Además se incrementó el tiempo de exposición de los cultivos a Se. De esta forma hemos conseguido una biomasa microalgal de *C. sorokiniana* enriquecida en Se con una concentración de $355 \pm 8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Los resultados de la cuantificación de las especies de Se mediante fase reversa revela que un 95% del contenido total en el alga fue transformada a especies orgánicas de Se, siendo la SeMet la especie mayoritaria (79% del Se total).

Para llevar a cabo el estudio de la bioaccesibilidad del Se se realizó una simulación de la digestión gastrointestinal de la microalga *C. sorokiniana* enriquecida en Se mediante un método *in vitro*, utilizando las enzimas digestivas pepsina y pancreatina. Para la determinación de las especies, se emplearon técnicas de separación cromatográficas bidimensional (exclusión de tamaño y fase reversa) con detección por ICP-MS.

Los resultados obtenidos mostraron que aproximadamente el 81% del Se total se extrajo después de la digestión simulada *in vitro*. Los estudios de especiación en el extracto gastrointestinal empleando la cromatografía SEC pusieron de manifiesto la hidrólisis de proteínas y otras moléculas de alto peso molecular que contienen Se a compuestos de bajo peso molecular. Los estudios de especiación por RP de los extractos hidrolizados mostraron que la distribución de las

especies no varió durante el proceso de digestión con respecto a las especies presentes inicialmente en la microalga, siendo la SeMet la especie mayoritaria (79% del Se total presente en la microalga), lo que confirma la biodisponibilidad de esta especie.

La estimación del Se en la fracción bioaccesible proporciona una información realista de la cantidad de Se liberado en el proceso digestivo del alimento, y que en principio estaría potencialmente a disposición del organismo. Aunque es cierto que esa información no tiene por qué corresponderse con la absorción final de un compuesto (biodisponibilidad), ya que ésta depende de factores como edad, sexo, estado nutricional, la ingesta de medicamentos, así como de otros nutrientes en la dieta que puedan inhibir o intensificar el contenido de otros compuestos, etc.

Basándonos en ello, se llevó a cabo el estudio del metabolismo y la acumulación de la SeMet en ratones alimentados con alga selenizada, la cual se obtuvo según los procedimientos descritos previamente.

Para realizar los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones *Mus Musculus*, que fueron divididos en cinco grupos, a cada uno de los cuales se les suministró una dieta de distinta composición: (a) dieta con pienso basal, (b) dieta con pienso basal mezclado con alga no expuesta a selenio, (c) dieta con pienso deficiente en Se mezclado con alga enriquecida en Se, para obtener una concentración final de $0.15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en el pienso compuesto resultante, y (d) y (e) dos dietas suplementadas en selenio a partir del alga enriquecida en Se, para obtener una concentración de 0.5 y $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente.

Transcurrido el tiempo de exposición, se sacrificaron los animales y se analizó el contenido de selenio total en hígado, riñón y suero, encontrándose que se producía un notable incremento del contenido de selenio en los órganos y en el suero del ratón cuando se incrementa la dosis de selenio en la dieta. En este trabajo también se aplicó un procedimiento metalómico para el estudio de las selenoproteínas en el suero. Los resultados revelan que la mayor parte del Se estaba en la forma de SeP. El aumento de la ingesta de Se en la dieta, produjo una disminución de la concentración de SeP en el suero, mientras que los niveles de GPx y SeAb se incrementaron.

Teniendo en cuenta que el hígado es uno de los órganos con mayor actividad metabólica y a su vez, de los más implicados en la

síntesis de selenoproteínas, se llevó a cabo un estudio metabolómico para estudiar el efecto del selenio suministrado en la dieta sobre el metabolismo. Para ello, los extractos polar y apolar, se analizaron mediante infusión directa en un sistema de triple cuadrupolo tiempo de vuelo con fuente de ionización electrospray, utilizando los modos de ionización positivo y negativo (DI-ESI(±)-QTOF-MS). A partir de los espectros obtenidos mediante infusión directa y utilizando los iones como descriptores, se llevó a cabo un análisis estadístico que permitió agrupar los animales según la dieta ingerida. Los cambios en el perfil de metabolitos en el hígado se identificaron mediante PLS-DA.

Este capítulo muestra el potencial de la metabolómica para evaluar la efectividad de los suplementos de selenio en microalgas. Por otra parte, el análisis mediante dilución isotópica proporciona una herramienta útil que permite en la actualidad la cuantificación de especies desconocidas de las que no se dispone de patrón comercial. Finalmente, este estudio ha permitido comprobar que el selenio orgánico se incorpora fundamentalmente a las selenoproteínas, con importantes funciones metabólicas, las cuales son distribuidas por el organismo. En la actualidad, se está trabajando en la identificación de los metabolitos mediante espectrometría de masas/masas para establecer las rutas metabólicas en las que influye el selenio.

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

In vitro selenium bioaccessibility from Se-enriched microalgae *Chlorella sorokiniana*

Verónica Gómez-Jacinto,^{a,b,c} Tamara García-Barrera^{a,b,c}, José Luis Gómez-Ariza^{a,b,c}, Inés Garbayo-Nores,^d Carlos Vilchez-Lobato^d

^aEnvironmental and Bioanalytical Chemistry Group, Departamento de Química y Ciencia de los Materiales "Profesor José Carlos Vilchez Martín", Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Huelva, Campus El Carmen, 21007-Huelva, Spain;

^bResearch Center of Health and Environment (CYSMA), University of Huelva, Spain.

^cInternational Campus of Excellence on Agrofood (ceiA3), University of Huelva, Spain

^dBiotechnology of Algae Group, International Centre for Environmental Research (CIECEM), Parque Dunar S/N, Matalascañas, Almonte, 21760-Huelva, Spain.

Author's e-mails:

V. Gómez-Jacinto (verónica.gomez@dqcm.uhu.es)

T. García-Barrera (tamara@dqcm.uhu.es)

J. L. Gómez-Ariza (ariza@uhu.es)

I. Gabayo-Nores (garbayo@dqcm.uhu.es)

C. Vilchez-Lobato (cvilchez@uhu.es)

Corresponding Authors

E-mail: tamara@dqcm.uhu.es, Department of Chemistry and Materials Science "Profesor José Carlos Vilchez Martín", Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Campus El Carmen, 21007-Huelva, Spain. Telephone number: (+34) 959219962. Fax number: (+34) 959219942.

Abstract:

Selenium is an essential trace element that has raised interest because of its antioxidant and anticancer properties. The beneficial or toxic effect of this element is not only dependent on the chemical form of the element but also on its bioaccessibility. The ability of green algae to incorporate and transform Se has been studied in *C. sorokiniana* exposed to 50 mg·L⁻¹ of selenate in the culture medium, accumulating up to 280.4 µg·g⁻¹ of SeMet. About 81% of the selenium was extracted after in vitro simulated gastrointestinal digestion and selenium molecular fractions were investigated by size exclusion HPLC-ICP-MS that reveals the hydrolysis of proteins and other high molecular weight selenium-containing molecules to peptides and low molecular weight selenocompounds. Analysis of gastrointestinal hydrolysates by reverse phase HPLC-ICP-MS showed that bioaccessible selenium was mainly present as selenomethionine, a good bioavailable source of this element, which accounted for 79% of total selenium present in the algae. This study open possibilities to obtain algae biomass enriched in this selenoamino acid to be used as selenium supplementary food for human and animals on the basis of selenium species bioavailability and bioaccessibility.

Keywords: Selenium, food, speciation, bioaccessibility, *Chlorella sorokiniana*

1. Introduction

Selenium has been largely recognized as a nutritionally essential element for human and animals, involved in work of functioning at the catalytic center of several selenoproteins (Rayman, 2000). There is evidence that Se deficiency is associated with health disorders including oxidative stress-related conditions, such as Keshan disease, cardiovascular disease and myocardial infarction (Rayman, 2000; 2002). A suitable intake of Se has many potential health benefits, including protective action against cardiovascular disease, enhancement in immune responses, improvement of thyroid health, and cancer risk reduction.

Selenium recommended dietary allowance (RDA) has been established at 55 $\mu\text{g d}^{-1}$ for adults. The content of selenium in foodstuff in several regions of the world is insufficient to provide the suitable protective activity so there is a great interest in the production of selenium fortified foods and selenium-based nutritional supplements (functional foods) as well as animal feed supplements.

Selenium nutritional status is greatly influenced by the bioavailability of Se. Therefore, the quality of the supplement will depend directly on the amount of Se present that is finally assimilated by the organism (Rayman et al., 2004). Selenomethionine (SeMet) is an essential selenoamino acid, which is the major nutritional source of Se for animals, and it is known to be highly bioavailable (Schrauzer, 2003). SeMet is retained in the organisms for a longer period of time after supplementation has finished and is the most suitable form of Se for this purpose (Rayman et al., 2000).

Chlorella, is a unicellular green algae considered as popular foodstuff worldwide, especially in Japan, China, USA and Europe. The administration of *Chlorella* to both humans and animals has demonstrated beneficial effects on numerous biochemical functions (Becker, 2007). These potential health benefits of *Chlorella* have been attributed to the effects of specific components of *Chlorella*, such as minerals, dietary fiber, and a wide range of antioxidant substances (Pulz & Gross, 2007; Spolare et al., 2006; Becker, 2007; Stengel, Connan & Popper,

2011). In addition, microalgae are able to efficiently metabolize Se into reduced Se-metabolites such as Se-amino acids, selenoproteins and volatile compounds (Neumann *et al.*, 2003; Pelah & Cohen, 2005; Gojkovic *et al.*, 2013; Gojkovic *et al.*, 2014; Umysová *et al.*, 2009).

Diverse analytical methodologies have been developed for the characterization and quantification of the different Se-species present in food and selenized food and most of these speciation studies have been based on water-soluble extracts. Although the chemical form in which selenium is present in food affects its bioaccessibility, the determination of the total content of Se and its species in food is not enough to evaluate its bioavailability. To achieve this goal analytical speciation studies focused on gastrointestinal absorbable fraction are necessary. In this way, stomach and small intestine digestion has been simulated by food treatment with pepsin at pH 2 (gastric digestion) followed by processing by amylase, pancreatin and bile salts at neutral pH (intestinal digestion) (Thiry *et al.*, 2012). The resulting extract is considered to be the bioaccessible fraction. By opposition, non-accessible Se cannot be absorbed through the intestinal membrane and is directly excreted. These *in vitro* experiments provide a good estimation of the processes occurring into living organisms and are a good alternative to human studies, because they are faster, cheaper, and simpler than *in vivo* experiments, especially because today there is a great interest in reducing the use of laboratory animals for testing (Waisberg *et al.*, 2004).

Regarding the nutritional importance of Se, the main objective of this paper is to evaluate the bioaccessibility of this element from enriched algae *Chlorella sorokiniana* using an *in vitro* digestion method that simulate stomach and intestinal physiology in order to prepare an antioxidant functional food based on selenized microalgae for animal and human.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

Selenium at trace levels and in Se-containing biomolecules was analyzed with an inductively coupled plasma mass spectrometer Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octapole collision/reaction cell. Chromatographic separations were performed using a model 1100 HPLC pump as delivery system with an UV detector (Agilent, Wilmington, DE, USA). The outlet of the HPLC column was directly connect via PEEK capillary tubing to the Micromist nebulizer of ICP-MS. Instrumental settings are shown in Table 1. ICP-MS measurement conditions for mode H₂ was optimized by using a HNO₃ 2% (v/v) aqueous solution of ⁵⁹Co, ⁷Li, ⁸⁹Y, and ²⁰⁵Tl (1 µg L⁻¹). Hydrogen at a flow-rate of 4 ml min⁻¹ was used as reaction gas to avoid polyatomic interferences in the plasma (such as ⁸⁰Ar₂, ³²S¹⁶O, ¹⁰Ca₂, and ⁴⁰Ar⁴⁰Ca).

An ultrasonic probe (HD 2200, Bandelin electronic, GmbH & Co. Kg, Berlin, Germany) with a MS 72 tip was used for the extraction of the Se-species. A centrifuge model Sigma Laborzentrifugen 4-10 (Osterode, Germany) was used to accelerate the phase separation process in the extraction of the compounds.

Samples mineralization for total selenium analysis was carried out with a microwave accelerated reaction system model MARS (CEM Corporation, Matthews, Carolina del Norte, USA) using MARSXpress vessels.

The total chlorophyll and carotenoids concentrations into the cells were calculated from the absorbance data obtained with a UV/vis spectrometer (Ultraspac 3100 pro, Biochrom Ltd). The photosynthetic activity was determined using a Clark electrode (Hansatech, UK). A Neubauer camera and an optical microscope Olympus model CX41 was used to measure the number of cells. Cells were grown in graduated bottle (5 L) of borosilicate glass Pyrex® using a volume of 4.5 L of culture.

2.2. Reagents and standard solutions

All reagents used were of analytical grade. Ultrapure water (18 M Ω cm) was obtained from a Milli-Q water-purification system and was used throughout (Millipore, UK). All the standard solutions were stored at 4° C in darkness until the analysis. The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany): KH₂PO₄, Na₂HPO₄ x 2H₂O, MgSO₄ x 7H₂O, CaCl₂ x 2H₂O, KNO₃, EDTA, Na₂EDTA x 2H₂O, H₃BO₃, MnCl₂ x 4H₂O, ZnSO₄ x 7H₂O, CuSO₄ x 5H₂O, NaHCO₃, D,L-selenomethionine (D,L-SeMet), Selenomethylselenocysteine (SeMetSec), selenocystine (SeCys₂), Na₂SeO₃, bile salts, enzymes (i.e., pepsin, pancreatin and amylase) and Protease XIV were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Na₂SeO₄ and tetraethylammonium chloride (TEAC) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Ammonium acetate, sodium hydroxide, nitric and hydrochloric acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

D,L-SeMet, SeCys₂ and SeMetSeCys were dissolved with ultrapure water and 3% HCl was added for better dissolution of SeCys₂ and SeMetSeCys. Inorganic selenium solutions were prepared by dissolving sodium selenate in 2% (v/v) HNO₃ solution and sodium selenite in 2% (v/v) HCl solution. Stock solutions of 1000 mg L⁻¹ were stored at 4° C in darkness, whereas working standard solutions were prepared daily by dilution.

The mobile phase used was 0.075% TEAC, adjusted at pH 4.5 with HCl solution. A tuning solution containing Li, Y, Tl and Ce (1 mg L⁻¹ each) was purchased from Agilent Technologies (USA). The reference material SELM-1 (selenium enriched yeast, 1381.43 ± 63.21 mg kg⁻¹ of SeMet) was obtained from the National Research Council of Canada.

Standards used for mass calibration of analytical, size exclusion chromatography columns (SEC; mass range 70- 3 kDa) were: ferritin (440 kDa) (purity 95%), bovine serum albumin (67 kDa) (purity 96%), superoxide dismutase containing Cu and Zn (32 kDa) (purity>70%), myoglobin (14kDa) (purity>98%), metallothionein I containing Cd, Cu, and Zn (7kDa) (purity>95%), and SeMet (196.11 Da) (purity>98%). All these reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The mobile phase solution used in SEC was 20 mM

of ammonium acetate (Suprapure grade) purchased from Merck (Darmstadt, Germany), which was prepared daily with ultrapure water (18M Ω cm) from a Milli-Q system (Millipore, Watford, UK) and the pH adjusted to 7.4 with ammonia solution, this later prepared by dilution of 20% (w/v) ammonia solution (Suprapur, Merck) with ultrapure water. The void volume was determined using ferritin (440 kDa).

2.3. Procedures

2.3.1. Preparation of *Chlorella sorokiniana* cultures

Microalgae *C. sorokiniana* CCAP 211/8K was obtained from the UTEX culture collection. The culture was in exponential growth phase and was maintained in Erlenmeyer flasks containing modified M-8 medium (pH 6.7) under incubation conditions of 30° C, a photon flux density of 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in continuous illumination. The components of basal culture medium are as follows (mol L⁻¹): KH₂PO₄, 5.4x10⁻³; Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1.5x10⁻³; MgSO₄ x 7H₂O, 1.6x10⁻³; CaCl₂ x 2H₂O, 0.9x10⁻⁴; KNO₃, 30x10⁻³; EDTA 0.3x10⁻³, Na₂EDTA x 2H₂O, 0.1x10⁻³; H₃BO₃, 1.0x10⁻⁶; MnCl₂ x 4 H₂O, 0.7x10⁻⁴; ZnSO₄ x 7H₂O, 0.1x10⁻⁴; CuSO₄ x 5H₂O, 0.7x10⁻⁵; NaHCO₃, 5x10⁻³. The sterilization of the medium was carried out during 20 min at 120 °C at a pressure of 1 atm. The medium was constantly bubbled with 5% (v/v) CO₂ in order to provide a carbon source, homogenize cells and reduce light shielding effect. Cultures were also examined under the microscope to evaluate cell viability and whether the increase in cell optical density was purely due to growth of microalgae or bacterial contaminants.

2.3.1.1. Algae culture growth inhibition tests

C. sorokiniana cells were exposed in the exponential growth phase to different concentrations of sodium selenate to determine the sub-lethal concentration of this specie. For this purpose, several cultures of *C. sorokiniana* were prepared with different concentrations of sodium selenate ranging from 5 to 200 mg L⁻¹ and compared with a control group without

selenium. Based on the data obtained in first experimental phase, 50 mg L⁻¹ selenate was determined as the optimal selenate concentration and applied in the next culture.

On the other hand, the medium culture was exposed to sodium selenate without the algae, to be determined whether any speciation occurs without involving the metabolism of *Chlorella*.

2.3.1.2. Measurement of the biochemical parameters in the cultures

Biomass concentration was determined by dry weight and optical density measurements. The dry weight of *C. sorokiniana* was determined by drying the cells at 80° C in a vacuum oven until constant weight. Cell numbers were counted using an optical microscope and a Neubauer camera.

The total content of chlorophyll and carotenoids was determined using the modified Arnon's method (Liechenthaler, 1987). The UV/vis absorbance was measured at 665, 653 and 470 nm and the total content of chlorophyll and carotenoids calculated using the equations proposed by H. Lichtenthaler (Liechenthaler, 1987).

The photosynthetic activity was measured with a Clark electrode at 25 °C under saturating white light (1500 μEm⁻²s⁻¹) or darkness (endogenous respiration).

2.3.2. Total Se determination

For the determination of total selenium in *C. sorokiniana*, the pellet obtained from the centrifugation of the culture was lyophilized and an amount of 100 mg was accurately weighted and submitted to acid digestion with 200 μL of H₂O₂ and 600 μL of HNO₃ (65% w/v). The samples were digested from room temperature to 160°C in 15 minutes and hold for 40 minutes at this last temperature. The final solutions were filtered through 0.45 μm PVDF filters. The

elements were measured by ICP-MS using the operative experimental conditions listed in Table 1.

2.3.3. Extraction of selenium species from C. sorokiniana

The algae pellet obtained after centrifugation was frozen with liquid nitrogen to break the wall cells and then lyophilized. The extraction of selenium species from 40 mg of lyophilized algae were performed by 2 min of sonication at 25% power after the addition of 5 mL of deionized water and 20 mg of Protease XIV. The extract was centrifuged at 6000 rpm for 5 min collecting the supernatant. The procedure was repeated with 5 mL ultrapure water. Finally the supernatants were pooled, filtered through 0.45 μ m and injected into the HPLC-ICP-MS.

2.3.4. In vitro simulated gastrointestinal digestion

The in vitro gastric/intestinal digestion method employed was based on that described by Bathia (*Bathia et al., 2013*). About 0.2 g of dried algae were incubated with 4 mL of gastric acid, which consisted of 1% w/v pepsin in 0.15 M NaCl adjusted to pH 2 with HCl 37% v/v. After 1 min of shaking for initial degassing, were held in a mixing thermostatic bath at 37°C for 4 hours.

After gastric digestion, sample pH was adjusted to pH 6.8 with saturated sodium bicarbonate solution. Then, 5 mL of intestinal juice, which consisted of 3% w/v pancreatin, 1.5% w/v amylase, 1% bile salts in 0.15 M NaCl, was added. The mixture was first vigorously shaken for 1 min and further incubated for 4 h in a thermostatic bath at 37° C under gentle shaking. Once the digestion was completed, samples were centrifuged at 7500 g and 4° C for 20

min, the supernatant was filtered through a 0.22 μ Millipore filter and solutions stored at -80°C until analysis. Procedural blanks were run to check the presence of Se in the reagents. The *in vitro* enzymolysis procedure was carried out in triplicate and the results were expressed as the mean value \pm standard deviation.

2.3.5. Selenium speciation analysis

Firstly, analysis of Se liberated by simulated gastrointestinal digestion was performed with a glass analytical size exclusion column SuperdexTM-75 (10 x 300 mm; 13 μm) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) with an exclusion limit of 100 kDa (effective separation range from 3 to 70 kDa). Ammonium acetate 20 mM (pH 7.4) was used as mobile phase, at flow rate 0.7 ml min⁻¹ and injection volume of 20 μl . The retention times corresponding to the peaks of standards used for Superdex-75 column calibration were the following: ferritin (Mw: 440 kDa), 11 min; BSA (Mw: 67 kDa), 12 min; superoxide dismutase (Mw: 32 kDa) containing Cu and Zn (Cu, Zn-SOD), 15 min; myoglobin (Mw: 14 kDa) an Fe containing protein, 17.5 min; metallothionein I containing Cd, Cu, and Zn (Cd, Cu, Zn-MT 1) (Mw: 7 kDa), 19 min; and selenomethionine (Mw: 196 Da), 24 min. Operational conditions for SEC-ICP-ORS-MS are shown in Table 1.

Selenium species liberated by simulated gastrointestinal digestion were characterized by RP-HPLC-ICP-MS. Cell extracts were ultrafiltered using AMICON cut-off filters of 3 kDa (Millipore, Darmstadt, Germany). A volume of 500 μL of extract was transferred to the filters and centrifuged at 4000 g, 60 min, and 4°C . The extracts containing molecular mass molecules lower than 3 kDa were taken to dryness under a N_2 stream and finally reconstituted with 100 μL of mobile phase. Before the injection, the samples were filtered using a microfilter of 0.45 μ of PVDF (low organic adsorption). The RP-HPLC-ICP-MS separations of Se species were carried out using a Phenomenex Luna C18 column. Se species present in the extracts were identified by

retention time matching with the standards. Optimal operation conditions for ICP-MS detection are similar to those for the determination of total selenium (Table 1). ^{77}Se , ^{80}Se , ^{82}Se were monitored, but only ^{80}Se was used for quantification in this work. A solution containing Li, Y, Tl and Ce ($1\ \mu\text{g L}^{-1}$ each) prepared in the mobile phase was used to tune the ICP-MS for sensitivity, resolution, percentage of oxides and doubly charged ions. The procedure for the chromatographic separation is summarized in Table 1. Chromatographic performance was checked regularly by measuring control standards to ensure enough separation between species and sensitivity of the method after the analysis of a considerable number of samples.

3. Results and discussion

3.1. *Quality control of the analytical methods*

Selenium recovery experiments were performed spiking algae pellets with different concentrations of selenium applying the Total Selenium Determination approach described above. Resulting recoveries were always higher than 90% for selenium with relative standard deviation values (calculated for three separate aliquots) ranging from 3 to 15 %, which were considered acceptable.

Analogously, recovery experiments for individual species were performed. For SeMet, the reference certified material SELM-1 (selenium enriched yeast) was used. The recoveries obtained were always higher than 95% with % RSD in the range 8 to 11% for all analytes. Interconversion of species was not observed. The limits of detection for SeCys₂, SeMetSec, SeMet and SeVI were $2.3\ \text{ng g}^{-1}$, $2.5\ \text{ng g}^{-1}$, $2.6\ \text{ng g}^{-1}$, and $2.9\ \text{ng g}^{-1}$, respectively.

3.2. *Effects of selenium on biomass and relative growth rate*

Toxic effect of selenate greatly depends on microalgae genus and species. Consequently, prior to production of Se-enriched biomass, specific toxicity analysis for the selected sub-lethal concentration is required. The microalgae culture status was monitored considering several physiological parameters, namely dry weight of biomass, pigment content and oxygen evolution measurement.

C. sorokiniana cells were exposed to different concentrations of sodium selenate to determine the sub-lethal concentration of this chemical specie in the alga. For this purpose, several cultures of *C. sorokiniana* were prepared with different concentrations of Se (VI) ranging from 5 to 200 mg L⁻¹ and compared with a control.

Our results show that *Chlorella* grown in a selenate enriched culture did not apparently exhibit symptoms of toxicity according to the biochemical parameters described under Experimental. However, Se concentration in the culture higher than 50 mg L⁻¹ reduced growth of *C. sorokiniana* significantly, possibly due to the toxic effects of a higher presence of Se. For 200 mg·L⁻¹ of selenate the reduction of cell number in the colony decreased dramatically until cell death (data not shown).

Biomass concentration for control culture and selenized cultures are presented in Figure 1. Data show that biomass concentration decreased for about 50% (50 mg Se L⁻¹ culture) compared to control but the culture remain viable (figure 1).

Oxygen evolution measurement is used as an economic and sensitive method for rapid detection of toxic effects on algal cultures. Oxygen evolution rates decreases from 0.26 μmolO₂·mg⁻¹Chl·h⁻¹ in the control to 0.17 μmolO₂·mg⁻¹Chl·h⁻¹ in the culture exposed to 50 mg L⁻¹ of selenate (data not shown). Then, in order to obtain SeMet enriched biomass maintaining simultaneously cell viability, a sublethal selenate concentration of 50 mg ·L⁻¹ was used.

In the literature, Se concentration range used in experiments varies significantly depending on microalgae species (Vítová et al., 2011; Morlon et al., 2005; Fournier et al., 2010; Bennett et al., 1988; Ibrahim & Spacie, 1990). Related studies on *S. quadricauda*

revealed that 50 mg L⁻¹ selenate in the medium was not lethal to microalga cultures as cells grew and divided normally (Umysová *et al.*, 2009), while *C. zofingiensis* was resistant to selenite concentrations up to 100 mgL⁻¹ (Pelah & Cohen, 2005).

3.3. Selenium accumulation and its effects on biomass and relative growth rate

The total selenium content was 355±8 µg·g⁻¹ dry weight (DW) in *C. sorokiniana* exposed to sodium selenate (50 mg·L⁻¹), showing that *C. sorokiniana* is an efficient Se accumulator. In previous studies, results showed a rapid Se absorption in the first few hours at the cell surfaces (Gómez-Jacinto *et al.*, 2012a; Gómez-Jacinto *et al.*, 2012b). The ability of other green algae to absorb inorganic Se from the culture medium and accumulate this element has been already reported. The total Se content in the microalgal biomass suggests that bioaccumulation of Se increases almost proportionally to the Se concentration in microalgal cultures (Umysová *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2003; Pelah & Cohen, 2005; Gojkovic *et al.*, 2013; Gojkovic *et al.*, 2014). Toxicity of Se is closely related to its bioaccumulation in algal biomass and the biotransformation suffered by incorporated inorganic selenium.

3.4. Accumulation of SeMet in *C. sorokiniana* in presence of selenate

Due to their reductive metabolism, *C. sorokiniana* incorporate selenite and selenate preferentially into selenoproteins and Se-aminoacids (Neumann *et al.*, 2003). Therefore, for Se releasing from proteins, enzymatic digestion of the samples was employed and analysis of Se species was carried out.

In Figure 2 is shown the chromatogram corresponding to Se-species analysis from *Chlorella* samples grown in the presence of 50 mg L⁻¹ of selenate. This reveals the presence of SeCys₂, SeMetSeCys, SeMet and Se (VI) were identified. Selenate was present 28.6±5 µg·g⁻¹,

but 95% of selenium content was transformed into organic species (Figure 2). SeMet is the main Se-species accumulated in Se-enriched algae, accounting for 79% of total accumulated Se, which is consistent with previous results reported by other authors in green algae under similar experimental conditions. In this way, Umysová et al. reported that wild type of *Scenedesmus quadricauda* accumulated $300 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ SeMet in the presence of $50 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of selenate (Umysová et al., 2009). In addition, it has been found that in *Chlorella* Se is present as SeMet representing more than 70 % of Se-containing protein in the algae, this results are analogous to that obtained infrom selenized yeast (Doucha, et al., 2009). Finally, Bottino et al., identified SeMetSeCys and SeCys amino acids in in *Chlorella* and *Dunaliella* sp. exposed to $10 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ selenite (Bottino et al., 1984).

In our study *Chlorella sorokiniana* exposed to $50 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ accumulated $280.4\pm 7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of SeMet. This fact is of a great importance because SeMet is highly suitable for nutritional supplementation as it is more bioavailable, less toxic and can provide higher Se concentration in tissue that inorganic Se, as previously reported (Schratzer, 2003; Rayman, 2004). SeMet is also one of the precursors of methylselenol, a potent anticarcinogen which inhibits tumour invasion and angiogenesis (Kim et al., 1984).

3.4. Bioaccessibility of Se and its species

The determination of total selenium content and Se-species distribution in food are not enough to determine the bioaccessibility of this element to mammal organisms. For this reason is necessary to determine the selenium and Se-species presence in gastrointestinal extracts. The in vitro digestion method utilized in this work comprises a simulation of both stomach and intestinal physiology. The analysis of total selenium and speciation studies in both digestions were used to predict the bioaccessibility of organic and inorganic selenium forms.

The soluble extract obtained after in vitro simulated gastrointestinal digestion of the selenized algae contained about $287.5\pm 6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of Se. This means that 81% of the Se taken up

the algae was solubilized in conditions simulating human gastrointestinal digestion and thus was potentially bioavailable. The residual fraction from the in vitro method was acid-digested in triplicate and analyzed for total selenium, giving a concentration for total selenium of $73 \pm 8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. The Se not solubilized after gastrointestinal digestion might be present in form of indigested Se-containing polysaccharides in its hemicellulotic cell wall structure.

3.6 Characterization of Selenium species extracted during “*in vitro*” gastrointestinal digestion

For a first fractionation of Se-containing species in the gastrointestinal extract according to their molecular weight, size exclusion HPLC-ICP-MS was used. Investigation of the Se molecular fractions by size exclusion chromatography revealed that high molecular weight selenium containing molecules were hydrolyzed to low molecular weight selenocompounds. A peak coeluting with a SeMet standard was already visible in the size exclusion chromatography (Figure 3).

For the characterization of Se species liberated after in vitro enzymolysis, reverse phase HPLC-ICP-MS was used. In relation to this, the oxidation of SeMet after in vitro or enzymolysis procedures has been reported (Dumont *et al.*, 2004). In addition, Dumont *et al.* indicated that SeOMet is generated after gastrointestinal digestion as degradation product of SeMet even after keeping the extract lyophilized at -20°C under Ar atmosphere (Dumont *et al.*, 2004). Other results obtained from selenized yeast showed that SeOMet is a degradation product after medium and long-term sample storage, while SeOMet was not detected when samples were immediately analysed (Gammelgaard *et al.*, 2003). This specie could be just an analytical artefact as previously observed by Larsen but not originated initially by the gastrointestinal digestion (Larsen *et al.* 2003).

Our results show that Se speciation in the gastrointestinal extract was dominated by SeMet, which represented 79% ($226 \pm 5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) of the total Se bioaccessible. SeOMet was not detected. In relation to inorganic selenium species, selenate was found at $7.6 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in gastrointestinal extract.

Because it is considered that selenium species found in the gastrointestinal juice constitute the bioaccessible fraction as a result of both gastric and intestinal digestion (Cabañero, Madrid & Cámara, 2004), the results described above suggest that almost all of selenium content in algae is potentially bioaccessible after gastrointestinal digestion, although many factors could affect it (Yoshida et al., 2002; Welch & Graham, 2005).

Several dietary factors such as type and degree of food processing, diet composition, presence of other metals, concomitant ingestion of certain drugs, and physiology factors such as nutritional state, growth, and pregnancy, together with the presence or absence of dietary micronutrient inhibitors or enhancers substances, can reduce or promote the selenium bioaccessibility (Yoshida et al., 2002; Welch & Graham, 2005).

4. Conclusion

The evaluation of Se-enriched algae as a possible dietary source of this element requires bioaccessibility and Se-species assessment from algae. This study investigated in vitro Se bioaccessibility in *C. sorokiniana*, a green algae that accumulated substantial Se amounts when cultivated on Se-enriched cultures. About eighty one percent of Se in the algae was extracted after in vitro simulated gastrointestinal digestion and size exclusion HPLC-ICP-MS revealed that all the Se was present as selenomethionine, which was confirmed by reverse phase HPLC-ICP-MS, accounting for 79% of bioaccessible Se.

Microalgal biomass, having fast growth and high ability to metabolize Se into low toxic reduced Se-metabolites, particularly SeMet, can be used as a biological carrier of bioactive Se-amino acids appropriate for supplementation in human and animals. Se-enriched *C. sorokiniana*

can be used as functional food, as ingredient in the formulation of nutraceuticals or as Se dietary supplement. Depending on the intended use, the production process can be adapted in order to achieve optimal Se concentrations in the algae.

Acknowledgements

The authors thank the projects CTM2012-38720-C03-01 (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness), P012-FQM-0442 and P09-FQM-04659 (Andalusian Ministry of Economy, Science, and Innovation Consejería de Innovación, Andalusian government). Verónica Gómez Jacinto thanks the Spanish Ministry of ministry of economy and competitiveness for a predoctoral scholarship.

References

- 1 Bathia, P., Aureli, F., D'Amato, M., Prakash, R., Cametra, S.H, Nagaraja T.P. & Cubadda, F. (2013). Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified Pleurotus mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. *Food Chemistry*, 140, 225-230.
- 2 Becker, E.W. (2007). Microalgae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25, 207-210.
- 3 Bennet, W.N. (1988). Assessment of selenium toxicity in algae using turbidostat culture. *Water Research*. 22, 939-942.
- 4 Bottino, N. R., Banks, C.H., Irgolic, K.J., Micks, Wheeler, A.E. & Zingaro. (1984). Selenium containing amino acids and proteins in marine algae. *Phytochemistry*. 23, 2445-2452.
- 5 Cabañero AI, Madrid Y & Cámara C. (2004). Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: An in vitro digestion method. *Analytica Chimica Acta*. 526, 51-61.
- 6 Doucha J., Livanský K., Kotrbáček V. & Zachleder V. (2009). Production of *Chlorella* biomass enriched by selenium and its use in animal nutrition: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83, 1001-1008.

- 7 Dumont E., Vanhaecke, F. & Cornelis, R. (2004). Hyphenated techniques for speciation of Se in vitro gastrointestinal digests of *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytica and Bioanalytical Chemistry*. 379, 504-511.
- 8 Fournier, E., Adam-Guillermin, C., Potin-Gautier, M. & Pannier, F. (2010). Selenate bioaccumulation and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*: influence of ambient sulphate ion concentration. *Aquatic Toxicology*. 97, 51–57.
- 9 Gammelgaard B., Cornett, C., Olsen, J., Bendahl, L. & Hansen, S.H. (2003). Combination of LC-ICP-MS, LC-MS and NMR for investigation of the oxidative degradation of selenomethionine. *Talanta*. 59, 1165-1171.
- 10 Gojkovic, Z., Garbayo-Nores, I., Gómez-Jacinto, V., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., Márová I. & Vilchez-Lobato, C. (2013). Continuous production of selenomethionine-enriched *Chlorella sorokiniana* biomass in a photobioreactor. *Process Biochemistry*. 48, 1235-1241.
- 11 Gojkovic, Z., Vilchez, C., Torronteras, R., Vigar, J., Gómez-Jacinto, V., Jancer, N., Gómez-Ariza, J.L., Márová I. & Garbayo-Nores, I. (2014). Effect of selenate on viability and selenomethionine accumulation of *Chlorella sorokiniana* grown in a batch culture. *The Scientific Word Journal*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/401265>.
- 12 Gómez-Jacinto, V., García-Barrera, T., Garbayo, I., Vilchez, C. & Gómez-Ariza, J.L. (2012a). Metallomic study of selenium biomolecules metabolized by the microalgae *Chlorella sorokiniana* in the biotechnological production of functional foods enriched in selenium. *Pure and Applied Chemistry*. 84, 269-280.
- 13 Gómez-Jacinto, V., García-Barrera, T., Garbayo, I., Vilchez, C. & Gómez-Ariza, J.L. (2012b). Metal metabolomics of microalgae *Chlorella sorokiniana* growing in selenium and iodine enriched media. *Chemické Listy*. 66, 821-828.
- 14 Ibrahim A.M. & Spacie A. (1990). Toxicity of inorganic selenium to the green alga *Selenastrum capricornutum* printz. *Environmental and Experimental Botany*. 30, 265-269.

- 15 Kim, A., Oh, J.H., Park, J.M. & Chung, A.S (1984). Methylselenol generated from selenomethionine by methioninase downregulates integrin expression and induces caspase mediated apoptosis of B₁₆F₁₀ melanoma cells. *Journal of Cell Physiology*. 212, 386-400.
- 16 Larsen E.H., Sloth, J., Hansen, S. & Moesgaard, S. (2003). Selenium speciation and isotope composition in Se-77-enriched yeast using gradient elution HPLC separation and ICP-dynamic reaction cell-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 18, 310-316.
- 17 Liechtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148, 350-382.
- 18 Morlon, H., Fortin, C., Floriani, M., Adam, C., Garnier-Laplace, J., & Boudou, A. (2005). Toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: comparison between effects at the population and sub-cellular level. *Aquatic Toxicology*. 73, 65-78.
- 19 Neumann P.M., DeSouza M.P., Pickering I.J. & Terry N. (2003). Rapid microalgal metabolism of selenate to volatile dimethylselenide. *Plant, Cell & Environment*. 26, 897-905.
- 20 Pelah D. & Cohen E. (2005). Cellular response of *Chlorella zofingiensis* to exogenous stress. *Plant Growth Regulation*. 45, 225-232.
- 21 Pulz, O. & Gross, W. (2007). Value products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*. 65, 35-648.
- 22 Rayman, M.P. (2000). The importance of selenium to human health. *Lancet*. 356, 233-241.
- 23 Rayman, M.P. (2002). The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society*. 61, 203-215.
- 24 Rayman, M.P. (2004). The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *British Journal of Nutrition*. 92, 557-573.

- 25 Schrauzer, G.N. (2003). The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine. *Advances in Food and Nutrition Research*. 47, 73-112.
- 26 Spolare, P., Joannis-Cassan, C., Duran E. & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101, 87-96.
- 27 Stengel, D.B, Connan, S. & Popper, Z.A. (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*. 29, 483-501.
- 28 Thiry, C., Ruttens, A., De Temmerman, L., Schneider Y.J. & Pussemier, L. (2012). Current knowledge in species related bioavailability of selenium in food. *Food Chemistry*. 130, 767-784.
- 29 Umyřová, D., Vítová M., Douřková, I., Biřová, I.K., Hlavová, M., Āizková, M., Machát, J., Doucha, J. & Zachleder, V. (2009). Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *BMC Plant Biology*. 9, 58-74.
- 30 Vítová, M., Biřová, K., Hlavová, M., Zachleder, V., Rucki, M. & Āizková, M. (2011). Glutathione peroxidase activity in the selenium-treated alga *Scenedesmus quadricauda*. *Aquatic Toxicology*, 102, 87-94.
- 31 Waisberg, M., Black, W.D., Waisberg, C.M. & Hale, B. (2004). The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (*Lactuca sativa L. cv. Ostinata*). *Food and Chemical Toxicology*. 42, 835-842.
- 32 Welch, R.M. & Graham, R.D. (2005). Agriculture: the real nexus for enhancing bioavailable micronutrients in food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 18, 299-307.
- 33 Yoshida, M., Abe, M., Fukumaga, K. & Kikuchi, K. (2002). Bioavailability of selenium in do defatted dark muscle of tuna. *Food Additives & Contaminants*. 19, 990-995.

LEGEND OF FIGURES

Figure 1. Biomass concentration ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) in *C. sorokiniana* cells.

Figure 2. Selenium species in *Chlorella sorokiniana* enriched in selenium. RP-HPLC-ICP-MS chromatogram (see Table 1 for operating conditions).

Figure 3. Selenium molecular fractions in a gastrointestinal extracts of *Chlorella sorokiniana* enriched in selenium SEC-HPLC-ICP-MS chromatogram (see Table 1 for operation conditions).

Table 1. Operating conditions for SEC-ICP-MS and RP-HPLC-ICP-ORS-MS

<i>HPLC conditions</i>	
Column	Superdex TM -75 (10 X 300 X 13 μm)
Resolution range	3-70 kDa
Mobile phase	Ammonium acetate 20 mM (pH 7.4)
Flow rate	0.7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Injection volumen	50 μL
UV detection	254 nm
<i>ICP-ORS-MS conditions</i>	
Column	Phenomenex Luna C18 (250 \times 4.6 \times 5 μm)
Mobile phase	TEAC, pH 4.5
Flow rate	1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Injection volume	20 μL
Forward power	1500 W
Plasma gas flow rate	15.0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Auxiliary gas flow rate	1.0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Carrier gas flow rate	0.9 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Sampling depth	8 mm
Sampling and skimmer cones	Ni
H ₂ flow	4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

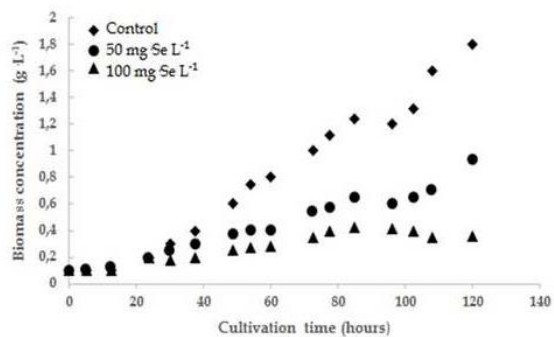


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

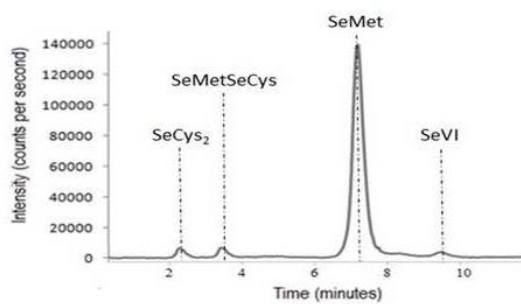
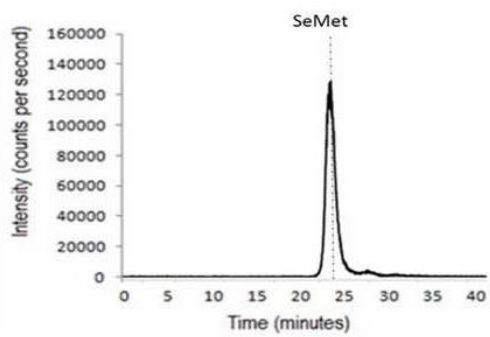


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)



Study of *in vivo* bioavailability of Se from enriched *Chlorella sorokiniana* used as food in the mice *Mus musculus*

Verónica Gómez-Jacinto,^{a,b,c} Tamara García-Barrera^{*a,b,c}, Francisco Navarro-Roldán^d, Zaida Montero-Roldán^d, José Luis Gómez-Ariza^{*a,b,c}

^aDepartment of Chemistry and Materials Science, Faculty of Experimental Science, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007 Huelva, Spain.

^bResearch Center of Health and Environment (CYSMA). University of Huelva.

^cInternational Campus of Excellence on Agrofood (ceiA3). University of Huelva. Spain

^dDepartment of Environmental Biology and Public Health, Cell Biology, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Campus El Carmen, 21007 Huelva, Spain.

Author's e-mails:

V. Gómez-Jacinto (verónica.gomez@dqcm.uhu.es)

T. García-Barrera (tamara@dqcm.uhu.es)

J. L. Gómez-Ariza (ariza@uhu.es)

Corresponding Authors

E-mail: ariza@uhu.es, Department of Chemistry and Materials Science "Professor José Carlos Vilchez Martín". Faculty of Experimental Sciences. University of Huelva. Campus El Carmen. 21007-Huelva. Spain. Telephone number: (+34) 959219968. Fax number: (+34) 959219942.

E-mail: tamara@dqcm.uhu.es, Department of Chemistry and Materials Science "Professor José Carlos Vilchez Martín". Faculty of Experimental Sciences. University of Huelva. Campus El Carmen. 21007-Huelva. Spain. Telephone number: (+34) 959219962. Fax number: (+34) 959219942.

Abstract:

Selenium is an essential micronutrient has been shown to prevent certain cancers in humans and animals. However, the dose and effects of selenium on cancer are controversial. The metabolism of Se depends on its chemical form, and studies have shown that the chemical form of Se in *Chlorella* is SeMet. The in vivo bioavailability of Se was investigated in enriched *Chlorella sorokiniana* microalgae. A bioavailability study was performed using 30 *Mus musculus* male mice separated in 5 groups and fed with different diets: with algae without Se, with enriched algae containing 0.15, 0.50 or 1 mg kg⁻¹ Se and a normal diet containing 0.15 mg kg⁻¹ of Se using basal diet. After five weeks, the animals were individually anesthetized by isoflurane inhalation and exsanguinated by cardiac puncture. Comparing with control group, Se content in serum and organs increased significantly from selenium supplemented groups. Increases in the ratios of selenium to albumin in either the serum or the albumin fraction occurred with the increases of selenium intake of these animals. We evaluated selenium bioavailability from algae, and its effect on the metabolism of metabolites using this mouse model. These results showed that Se-enriched mushrooms can be considered as an alternative Se food source for humans, due to their high bioavailability.

Keywords: *selenium, food, bioavailability, selenoproteins, metabolites*

1. Introduction

Selenium is an essential trace element that plays important roles in humans and animals (Rayman, 2000), existing a very critical equilibrium between excessive and insufficient intake that can result in adverse health effects (Gan et al., 2002; Fairweather-Tait et al., 2011; Bermano et al., 1995; Balogh et al., 2004). Therefore, a suitable dose of Se has many potential health benefits, including protective effect against cardiovascular disease, enhancement of immune response, improvement of thyroid health, and reduction of cancer risk.

Selenium is very well known for its antioxidant properties that are mediated by several selenoproteins, such as extracellular glutathione peroxidase (eGPx) (Maddipati and Marnett, 1987; Broderick et al., 1987), and selenoprotein P (SeP) (Akeson and Martensson, 1991; Gao et al., 2004), which contain selenocysteine incorporated at active sites, versus selenoalbumin (SeAlb) (Butler et al., 1990) not considered as a selenoprotein, because the element is not strongly incorporated into the albumin moiety as selenomethionine (SeMet) (Mostert, 2000; Thomson, 1998). SeP is a major selenoprotein in mammalian plasma, and its concentration is a good indicator of Se status in humans, while eGPx activity in human serum is a useful marker of oxidative stress in clinical studies. On the other hand, SeAlb is assumed to be transported to liver for SeP synthesis that is then released into the bloodstream (Suzuki, 2002). Although the antioxidant activity of purified SeP has been demonstrated, as well as its reducing activity against phospholipids hydroperoxides similarly to eGPx, its biological action mechanisms are still unclear (Saito et al., 1999). In addition, selenometabolites (selenoamino acids and inorganic forms of selenium) also play important physiological roles in plasma, although the data about their presence in this fluid is scarce and not convincingly documented.

A recommended dietary allowance (RDA) of 55 $\mu\text{g d}^{-1}$ has been established for adults, but the content of selenium in foodstuff from several regions of the world is insufficient to offer a proper protective activity, so there is an increasing interest in the production of selenium fortified foods and selenium-based nutritional supplements (functional foods) as healthy food or animal feed supplements.

Despite being an essential trace element, selenium is also toxic at levels not much higher than the beneficial requirements. For instance chemopreventive effects of selenium in animals usually occur for diets containing 1-3 µg Se/g (*Ip and Ganther, 1990*), whereas chronic dietary selenium toxicity begins at 3-5 µg Se/g, and there is almost no survival for rats fed with 16 µg Se/g (*Harr et al., 1967; Martin and Hurlbut, 1976; Koller and Exon, 1986*). In addition, the beneficial or toxic effect of Se is not only dose-dependent, but also related to the chemical forms in which the element is present, which determines selenium bioavailability together to food composition. In this way, organic selenium has beneficial biological effects and disease prevention action (*Clark et al., 1996; Flores-Mateo et al., 2006*), because of the incorporation of Se into selenoproteins that reduce cellular oxidative stress arising from free radical damage.

Selenomethionine (SeMet) is an essential selenoamino acid, which is the major nutritional source of Se for animals due to be highly bioavailable (*Rayman 2000*). SeMet is a selenium analog to methionine, an amino acid containing sulphur, which is favourably absorbed in the intestine and non-specifically incorporated into proteins in place of methionine, because it is biologically indistinguishable from methionine in animal metabolism (*Behne et al., 1990; Daniels, 1996*). However, selenomethionine degrades to an inorganic form of selenium, such as selenide, before it can be incorporated to selenoproteins structure (*Burk et al., 2003*). The bioavailability of Se is defined as the fraction of an ingested element that is absorbed through the intestinal tract passing into the bloodstream to be translocated to the different organs to participate in different physiological functions (*Tapiero et al., 2003*). The levels of Se in the different tissues and the concentration of SeP in blood can be related with Se bioavailability (*Finley, 2006; Pedrero & Madrid, 2009*).

Chlorella is a type of unicellular green algae considered as a popular foodstuff worldwide, especially in Japan, China, U.S.A, and Europe. *Chlorella* intake by humans and animals has demonstrated beneficial effects on numerous biochemical functions (*Becker, 2007*), which can be attributed to specific components in the algae, such as minerals, dietary fibers, and a wide range of antioxidants and chlorophylls (*Pulz & Gross, 2007; Spolare et al., 2006; Becker, 2007; Stengel, Connan & Popper, 2011*). Antioxidant activity is considered to

play an important role in the protective effects of *Chlorella*. Microalgae are able to efficiently metabolise Se into Se-metabolites with reducing properties, such as Se-amino acids, selenoproteins and volatile compounds (Umysová *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2003; Pelah & Cohen, 2005; Gojkovic *et al.*, 2013; Gojkovic *et al.*, 2014). Other studies report the presence of organic Se species, such as selenomethionine in Se-enriched *Chlorella sorokiniana* cultivated in selenium enriched medium (Gómez-Jacinto *et al.*, 2012a; Gómez-Jacinto *et al.*, 2012b). These selenized algae can be an alternative for the preparation of functional foods for dietary a health purposes.

The main objective of this study is to evaluate the bioavailability of selenium from Se-enriched algae *Chlorella sorokiniana* at different concentrations of this element (0.15, 0.5 and 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), in the laboratory mouse *Mus musculus* fed with the microalgae. For this purpose a metallomic approach based on the use of ICP-MS and the multidimensional coupling 2D-SEC-AF-SUID-ICP-MS have been optimized to quantify selenium containing proteins in mice serum. In addition, conventional biochemical parameters have been performed in mice blood. On the other hand, we therefore approached the metabolic impairments in liver from the analysis of metabolite profiles in mice with different selenium doses in the diet.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

Selenium trace levels and selenium-containing biomolecules were analyzed with an inductively coupled plasma mass spectrometer Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octapole collision/reaction cell. Chromatographic separations were performed using a model 1100 HPLC pump as delivery system with an UV detector (Agilent, Wilmington, DE, USA). The outlet of the HPLC column was directly connected via PEEK capillary tubing to the Micromist nebulizer of ICP-MS. Instrumental settings are shown in Table 1. ICP-MS measurement conditions for mode H₂ was optimized by using a HNO₃ 2% (*v/v*) aqueous solution of ⁵⁹Co, ⁷Li, ⁸⁹Y, and ²⁰⁵Tl (1 $\mu\text{g L}^{-1}$). Hydrogen at a flow-rate of 4 ml min⁻¹ was used as reaction gas to avoid polyatomic interferences in the plasma (such as ⁸⁰Ar₂, ³²S¹⁶O, ¹⁰Ca², and ⁴⁰Ar⁴⁰Ca).

2.2. Reagents and standard solutions

All the standard solutions were stored at 4° C in the darkness until the analysis. The following reagents were purchased from SigmaAldrich (Steinheim, Germany): KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , EDTA, $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , D,L-selenomethionine (D,L-SeMet), Se-methylselenocysteine (SeMeSec), selenocystine (SeCys₂), and Protease XIV. Na_2SeO_4 and tetraethylammonium chloride (TEAC) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland).

The mobile phase used was 0.075% TEAC, adjusted at pH 4.5 with HCl solution. A tuning solution containing Li, Y, Tl and Ce (1 mg L⁻¹ each) was purchased from Agilent Technologies (USA). The reference material SELM-1 (selenium enriched yeast, 1381.43 ± 63.21 mg kg⁻¹ of SeMet) was obtained from the National Research Council of Canada.

Human serum certified reference material (CRM) BCR-637 was purchased from the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Belgium). A standard solution of 1000 mg L⁻¹ of Se stabilized in 5% (v/v) nitric acid Suprapur and other of 1000 mg L⁻¹ of bromide stabilized in 5% (v/v) nitric acid Suprapur were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Enriched ⁷⁴Se powder was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA) and dissolved in the minimum volume of nitric acid (Suprapur grade), finally diluted to volume with ultrapure water.

The complete resolution of the selenium species was carried out with two 5 ml HiTrap® desalting columns (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), in series connected to two affinity columns, with stationary phases of heparin sepharose (HEP-HP) and blue-sepharose (BLU-HP), both purchased from GE Healthcare, Uppsala, Sweden.

2.3. Procedures

2.3.1. Preparation of *Chlorella sorokiniana* cultures

Microalgae *C. sorokiniana* CCAP 211/8K was obtained from the UTEX culture collection. The culture was in exponential grown phase and was maintained in modified M-8 medium with 160 μmol of photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (continuous illumination) at 30 °C. The medium contains the following reagents (mol L^{-1}): KH_2PO_4 , 5.4×10^{-3} ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5×10^{-3} ; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1.6×10^{-3} ; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.9×10^{-4} ; KNO_3 , 30×10^{-3} ; EDTA 0.3×10^{-3} , $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1×10^{-3} ; H_3BO_3 , 1.0×10^{-6} ; $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0.7×10^{-4} ; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1×10^{-4} ; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0.7×10^{-5} ; NaHCO_3 , 5×10^{-3} . The pH was adjusted at 6.7 using NaOH. The sterilization of the medium was carried out during 20 min at 120° C at a pressure of 1 atm. The medium was constantly bubbled with 5% (v/v) CO_2 in order to provide a carbon source, homogenize cells and reduce light shielding effect. Cultures were also examined under the microscope to evaluate cell viability and whether the increase in cell optical density was purely due to growth of microalgae or bacterial contaminants. Two different cultures were prepared: (i) Control culture non-exposed to selenium; and (ii) culture exposed to 50 ppm of D, LSeMet (as Se).

2.3.2. Preparation of Se-containing foodstuffs based on enriched algae for mice feed

Several foodstuffs with different concentration of selenium were prepared on the basis of Se-enriched *Chlorella sorokinina*, which was used for mice feed in order to check selenium bioavailability:

- (a) A group of animals were fed with a commercial feed containing 0.15 μg Se/g to be used as control group (Diet I).
- (b) A second experience was performed adding concentrated algae biomass non-exposed to selenium to the commercial feed to check the influence of algae in mice metabolism. The final Se content in the feed was about 0.15 μg Se/g (Diet II).

- (c) Selenium enriched feed prepared by supplementing Se-deficient commercial feed with Se-enriched algae to get a final Se concentration of $0.15 \mu\text{g Se/g}$ (Diet III).
- (d) Similarly to (c), feeds were prepared using algae with increasing concentrations of Se to provide final foodstuff with $0.5 \mu\text{g Se/g}$ (Diet IV) and $1 \mu\text{g Se/g}$ (Diets V).

All diets (Fig. 1) contained the same amount of algae that was adjusted in each case adding when necessary control algae without selenium. The composition of the formulated control and mixed diet were analyzed for Se and other metals before to be administrated to mice.

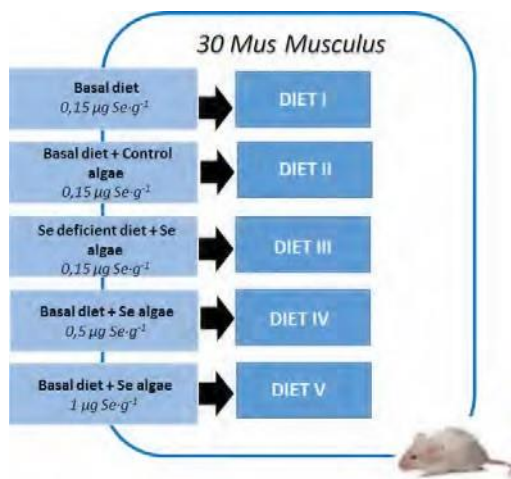


Figure 1. Diets used to evaluate the effect of Se-enriched algae in *Mus Musculus*

2.3.3. Total selenium determination in foodstuffs for mice diets

For the determination of total selenium in the different diets provided to mice, an amount of 100 mg of feed pellets was accurately weighted and submitted to acid digestion with 200 μL of H_2O_2 and 600 μL of HNO_3 (65% w/v). The samples were digested from room temperature to 160°C in 15 minutes and hold for 40 minutes at this last temperature. The final solutions were filtered through 0.45 μm PVDF filters. The elements were measured by ICP-MS, using the operative experimental conditions collected in Table 1.

2.3.4. Determination of selenium species in algae pellets

The extraction of selenium species from 40 mg of feed pellets were performed by 2 min of sonication at 25% power after the addition of 5 mL of deionized water and 20 mg of Protease XIV. After extraction, the extract was centrifuged at 6000 rpm for 5 min and the supernatant collected. The procedure was repeated with 5 mL of ultrapure water. Finally, the supernatants were pooled, filtered through 0.45 μm and injected into the HPLC-ICP-MS.

The RP-HPLC-ICP-MS separation of Se species was carried out using a Phenomenex Luna C18 column. Se species in the extracts were identified by retention time matching with the standard substances spiked in sample extracts. Optimal operation conditions for ICP-MS detection are similar to those for the determination of total selenium (Table 1). ^{77}Se , ^{80}Se , ^{82}Se were monitored, but only ^{80}Se was used for quantification in this work. A solution containing Li, Y, Tl and Ce ($1 \mu\text{g L}^{-1}$ each) prepared in the mobile phase was used to tune the ICP-MS for sensitivity, resolution, percentage of oxides and doubly charged ions. The procedure for the chromatographic separation is summarized in Table 1. Chromatographic performance was checked regularly by measuring control standards to ensure enough separation between species and sensitivity of the method after the analysis of a considerable number of samples.

ICP-MS conditions	
Forward power	1,500 W
Plasma gas flow rate	15 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	1 L min ⁻¹
Carrier gas flow rate	0.15 L min ⁻¹
Sampling depth	7 mm
Sampling and skimmer cones	Ni
H ₂ flow	4 mL min ⁻¹
Nebulizer	MicroMist (Glass Expansion)
Torch	Shield (with long life platinum shield plate)
Q _{oct}	-18 V
Q _p	-16 V
Points per peak	1
Integration time	0.3 per isotope
Replicates	1
Chromatographic conditions of 2D/SE-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-MS	
Sample loop	100 µL
Flow rate	1.3 mL min ⁻¹
Mobile phase A	0.05 M ammonium acetate pH 7.4
Mobile phase B	1.5 M ammonium acetate pH 7.4
Gradient	0-7 min 100% A 6-18 min 100% B 18-20 min 100% A
Valve position	1-10 min inject 10-17 min load 17-20 min inject
Chromatographic conditions of RP-HPLC-ICP-ORS-MS	
Column	Phenomenex Luna C18 (250x4.6x5µm)
Mobile phase	TEAC, pH 4.5
Flow rate	1 mL min ⁻¹
Sample loop	20 µL

Table 1. Operating conditions for SEC-ICP-MS, 2D/SE-AF-HPLC-SUID-ICPORS-MS and RP-HPLC-ICP-ORS-MS.

2.3.5. Animals and experiment exposure

Mus musculus (inbred BALB/c strain) mice were obtained from Charles River Laboratory (Spain) (initially weighting 21.67 ± 1.95 g, $n = 30$). Mice of 7 weeks age were fed ad libitum with conventional pellets. The animals were allowed to acclimate for 5 days with free access to food and water to adjust the Se status and to adapt to the new environment before the experiment period. Mice were randomly divided into 5 experimental groups (for Diets from I to V) and housed in cages. Animals were fed with the respective diets for 5 consecutive weeks. Body weights of the animals were recorded at the start of the experiment and repeated weekly in order to monitor their growth. Food intake and behaviour of mice were also monitored throughout the experiment.

After exposure mice were individually anesthetized by isoflurane inhalation and exsanguinated by cardiac puncture, dissected using a ceramic scalpel and finally organs transferred rapidly to dry ice. Individual organs were excised, weighed in Eppendorf vials, cleaned with 0.9% NaCl solution, frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C until extraction. Serum was obtained by centrifugation (4000 g, 30 min, 4° C) of whole blood after incubation during 30 min at 37° C in the dark. All animals received humane care in compliance with the guidelines for animal care proposed by the European Community. The investigation was performed after approval by the Ethical Committee of the University of Huelva (Spain).

2.3.6. Measurement of the clinical parameters in blood mice

Blood activity of alanine transferase, alkaline phosphatase, amilase, lipase and aspartate transferase and concentrations of bilirubin, albumin, ferritin, LDL, HDL, triglycerides and creatinine were determined. Standard controls were run before each determination, and the values obtained for the different biochemical parameters were always within the expected ranges. The intra-assay variability of biochemical tests was relative to 12 repeated determinations of the control serum in the same analytical session, whereas inter-assay variability for each parameter was calculated on the mean values of control sera measured during 6 analytical sessions.

2.3.7. Determination of total metals in organs and serum

First of all, individual organs were disrupted by cryogenic homogenization. For total metal determination, three samples of plasma and pulverized organs of mice from each group were exactly weighted (~ 100 mg) in 5-ml microwave vessels and 500 mg of a mixture containing nitric acid and hydrogen peroxidase (4:1 v/v) was added. The mineralization was performed by raising temperature to 160° C in 15 min and held for 10 min at this temperature at 400 W. Then the solutions were made up to 2 g with ultrapure water and the metals analyzed by ICP-MS. The element Rh was added as internal standard (1 ng g⁻¹). All samples were measured for 3 times and the results are presenting as means ± standard deviation (n = 3).

2.3.8. Selenoproteins speciation by two-dimensional size exclusion affinity chromatography followed by specie-unspecific isotope dilution and ICP-MS

Separation of the analytes was performed by in series stacking of two 5 ml HiTrap® desalting columns in series connected with a dual affinity column arrangement comprising a 1ml HEP-HP column and a 1 ml BLU-HP column interconnected by a six-way switching column valve. The HiTrap® column is based on size-exclusion principle, and the combination of two columns increases the resolution of the chromatographic separation. On the other hand, the HEP-HP column is able to retain selectively SeP, whereas BLUE-HP column retains both SeP and SeAlb (*Jitaru et al., 2010; Deagen et al., 1993; Harrison et al., 1996*).

To avoid changes in selenium species, the samples were directly injected into the column, without prior dilution to evaluate the effects of selenium containing proteins by in series two-dimensional size exclusion and affinity high performance liquid chromatography with ICP-MS detection (2D/SEC-AF-ICP-ORS-MS) (*García-Sevillano et al., 2012*). The fractionation of selenium containing proteins by two-dimensional chromatographic separations, based on SEC prior to the use of a double affinity column, was carried out following a procedure described elsewhere (*García-Sevillano et al., 2013*).

The quantification of selenium containing proteins and seleniummetabolites in the different chromatographic peaks was carried out by postcolumn species-unspecific isotopic dilution (SUID) analysis as described by C. Sariego-Muñiz et al. (*Sariego-Muñiz et al., 2001*). The intensity of different Se isotopes and polyatomic interferences were converted to mass flow chromatogram for the quantification of selenium species in plasma and serum samples. Mathematical treatments were applied to correct BrH^+ and SeH^+ polyatomic interferences. Mass bias corrections were applied by using the $^{78}\text{Se}/^{74}\text{Se}$ and $^{80}\text{Se}/^{74}\text{Se}$ isotopes ratios, calculated (exponential mode) as previously described by J. Ruiz-Encinar et al. (*Encinar et al., 2004*). Finally, online dilution equation was applied to each point of the chromatogram and the amount of selenium in each chromatographic peak calculated by using the Origin 8.5.1 software (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA).

2.3.9. Analysis of metabolites by DI-ESI(±)QTOF-MS

For metabolomic analysis, metabolite extraction from individual liver was carried out in a two-step approach following a procedure described elsewhere. First of all, individual organs were disrupted by cryogenic homogenization. Polar metabolites were extracted with methanol with 0.1% formic acid by adding 300 μL to 30 mg of tissue in an Eppendorf tube followed by vigorous vortex shaking during 2 min. Then, the cells were disrupted using a pellet mixer (2 min) under low temperature, followed by centrifugation at $10,000\times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatant was carefully collected and transferred to another Eppendorf. The pellet was homogenized again, using a pellet mixer for 2 min with 300 μL of (2:1, v/v) chloroform/methanol with 0.1% formic acid to extract lipophilic metabolites, then it was centrifuged at the same conditions.

Metabolomic experiments of liver extracts from mice were performed by DIMS using an ESI. The parameters for hybrid analyzer QqQ-TOF system were optimized to obtain the higher sensitivity with minimal fragmentation of molecular ions, both in positive and negative ion modes. To acquire MS/MS spectra, nitrogen was used as collision gas (Table 2). Both extracts were analyzed in positive (ESI+) and negative (ESI-) ion modes resulting different profiles in a wide spectral range (m/z 50–1,100).

DI-ESI(±)-QTOF-MS conditions		
Flow	5 $\mu\text{L min}^{-1}$	
Acquisition time	0.2 min (1.005 s per scan)	
m/z range	50–1,100	
Curtain gas (N_2)	1.13 L min^{-1}	
Nebulizer gas (N_2)	1.56 L min^{-1}	
Source temperature	60 °C	
	Acquisition mode	
	Positive	Negative
Ion spray voltage (IS)	3500 V	–4,000 V
Declustering potential (DP)	60 V	–100 V
Focusing potential (FP)	250 V	–250 V
Ion energy (IE)	2.0 V	–2.0 V
Channel electron multiplier (CEM)	2,400 V	2,400 V

Table 2. Operating conditions for DI-ESI(±)-QTOF-MS.

Data analysis Markerview™ software (Applied Biosystems) was employed to filter the mass spectrometric results. Statistical data analysis (Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were performed by means of statistical software packages SIMCA-P™ (version 11.5, published by UMetrics AB, Umeå, Sweden). PLS-DA is a partial least squares regression of a set Y of binary variables describing the categories of a categorical variable on a set X of predictor variables. It is a compromise between the usual discriminant analysis and a discriminant analysis on the significant principal components of the predictor variables (*Pérez-Enciso & Tenenhaus, 2003*). The data were processed in order to find differences between mice groups submitted to different diets and to trace the metabolites altered by selenium for later identification by their molecular mass and fragments in MS/MS experiments.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of *Chlorella sorokiniana*

Prior to administering the diet to experimental animals, both algae *C. sorokiniana* control and algae formulation for diets were characterized in terms

of total selenium and other toxic elements occurrence as well as the presence of selenium species. Selenium was not detected in control algae and the medium selenium concentration in Se-enriched alga was $408 \mu\text{g g}^{-1}$. The different diets used to feed animals provide selenium concentration values that are shown in Table 3, being SeMet the major Se-species found in Se-enriched algae, accounting for 90% of total selenium present, which denotes the suitability of this alga for SeMet intake. Other toxic elements are present at very low concentrations.

To ensure appropriate growth of experimental animals, toxic elements were measured in the diets. The results indicate that Se enriched algae preparation is an easy and cheap alternative to obtain SeMet. Once Se-enriched diet was prepared, it was employed to evaluate Se-algae metabolism in mice fed with diets with different concentration of Se in diets.

Elements	Recommended limits	Diet I	Diet II	Diet III	Diet IV	Diet V
Se	$<0,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0,15	0,16	0,16	0,67	1,13
Cu	10-35	33,92	36	36	36	36
Pb	1,5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Hg	<0,1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
As	<1	0,06	0,07	0,06	0,07	0,07
Cd	<0,250	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Table 3. Concentrations of Se and toxic metals in differents diets.

3.2. Mice body weight evolution under Se supplementation

Mice body weights changes in the different Se-supplemented groups along the time are shown in Figure 2. There were no obvious differences from the initial body weight among four groups. However, from day 10, the average body weight of mice fed with algae supplemented with Se was higher in Se-enriched algae with $0.15 \mu\text{g}/\text{Se}/\text{g}$ (Diet III) than that of mice from other groups. During the entire period of the study, no obvious symptoms of mice health impairment or hair, nail or skin damage were observed in all groups of animals.

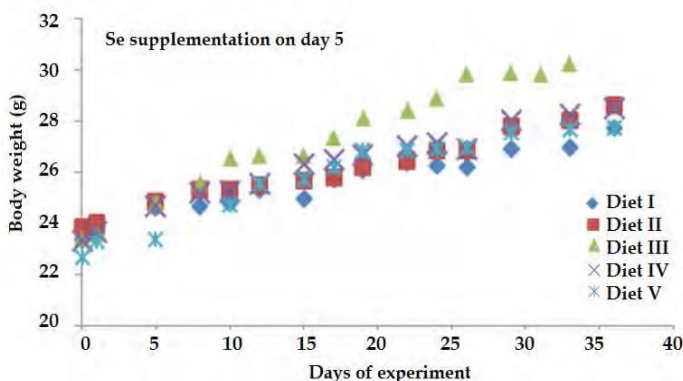


Figure 2. Body weight changes of mice during the experiment.

3.3. Biochemical parameters in blood of mice fed with Se-enriched algae

Blood sampling study was performed by the same skilled technician for all samples, and all manipulations performed before and after blood collection were accurately settled, so that variability caused by blood sampling was negligible. In the present study, the level of haemolysis in all serum samples was scored by direct observation. The results obtained in the last day of the experiment are shown in Table 4.

Data obtained revealed that administration of Se at high doses (Diet V) increases the levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST). AST is widely used to assess the liver function. ALT is a cytoplasmic enzyme while AST is found in both cytoplasm and mitochondria. ALT increased in a cirrhotic liver and AST in myocardial infarction, liver diseases, liver cancer and liver cirrhosis. Therefore, increase of ALT and AST is denoting a potential injury of excessive intake of selenium in Diet V, mainly in liver that is a primary defense organ that detoxifies drugs and xenobiotics.

Results from table 4 reveal that under the same experimental conditions, treatment with 0.15 or 0.5 $\mu\text{g Se/g}$ did not change significantly the serum levels of any of the biochemical parameters measured compared to control group, with the exception of tryglicerides, decreasing the levels under diets supplemented with selenium.

Clinical parameters (mean \pm SD)	Bilirubin mg/dL	Glucose	Albumin gr/dL	LDL mg/dL	HDL mg/dL	Alanine transpherase UI/L
Control group	0.04 \pm 0.01	149.1	2.9 \pm 0.5	77 \pm 5	104.9 \pm 8	92 \pm 8
Control algae group	0.05 \pm 0.02	130.4	2.8 \pm 0.7	58 \pm 6	111.7 \pm 11	107.3 \pm 11
0.15 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ algae	0.04 \pm 0.01	136	2.7 \pm 0.4	64 \pm 6	115 \pm 9	94 \pm 9
0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ algae	0.06 \pm 0.01	136.2	2.8 \pm 0.5	62 \pm 4	110.2 \pm 10	106.6 \pm 9
1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ algae	0.05 \pm 0.02	122.8	2.9 \pm 0.6	60 \pm 7	99 \pm 11	166.6 \pm 15
Clinical parameters (mean \pm SD)	Alkaline phosphatase \pm UI/L	Amilase UI/L	Triglycerides mg/dL	Lipase UI/L	Creatinine mg/dL	Aspartate transpherase UI/L
Control group	109 \pm 11	2829.7 \pm 251	266 \pm 14	37.6	0.27	393.2
Control algae group	104 \pm 13	2581.8 \pm 303	255 \pm 12	34.4	0.25	446.1
0.15 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ algae	104 \pm 15	2237 \pm 189	273 \pm 19	32.5	0.25	694
0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ algae	103 \pm 12	2670.9 \pm 225	123.9 \pm 18	28.3	0.2	747
1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ algae	111 \pm 11	3455 \pm 275	169.7 \pm 16	27.7	0.24	1172.4

Table 4. Clinical parameters in blood from *Mus musculus* mice under different doses of Se in diets.

3.4. Total selenium distribution in mice *M. musculus* after selenized-algae feeding

The presence of Se in the organs and serum of *M. musculus* fed with different Se diets was determined by IDA-ICP-MS after acid digestion, and the results are shown in figure 3. Recovery experiments were performed by spiking the extracts with different concentrations of analytes depending on the relative concentration of each in the extracts.

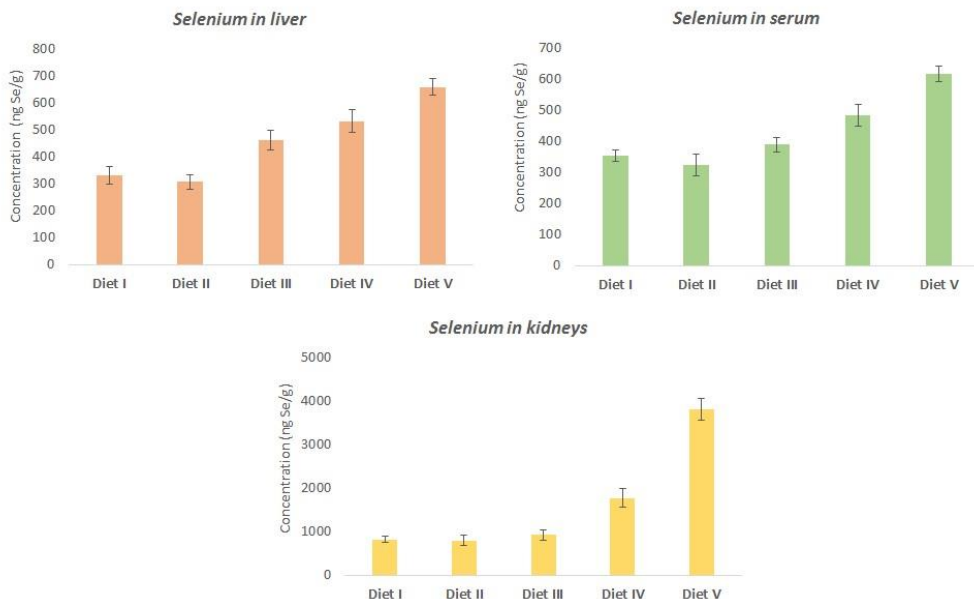


Figure 3. Concentrations of Se in serum, liver and kidneys.

The results show that selenium concentration in organs was always higher in the groups fed with higher dose of Se-algae. Se concentration levels are similar in liver and serum ranging from 300 to 600 ng of Se g⁻¹, but the selenium concentration in kidney increases drastically, especially for high Se-dose diets (Diet IV and diet V), reflecting a potencial mechanism of excretion of Se by urine. These results also provide evidence about the preferential accumulation of selenium in specific organs.

3.5. Speciation of Se in plasma of mice *M. musculus* under algae Se-enriched diet

Quantification of Se containing proteins (selenoprotein P (SeP), extracellular glutathione peroxidase (eGPx) and selenoalbumin (SeAlb)) as well as low molecular weight Se-species has been performed in mice plasma using the speciation approach described under Experimental, which provides values of selenium concentration in selenoproteins in good accordance with total Se concentrations determined by IDA-ICPORS-MS after acid digestion.

In mammalian bloodstream, selenium is mainly associated to the three selenoproteins SeP, eGPx, SeAlb and Se-metabolites. SeP is the major Se-specie in mice plasma, especially after feeding a diet supplemented with selenium-enriched algae Table 4.

Group	DIET I	DIET II	DIET III	DIET IV	DIET V	Limits of detection (LOD)
GPx (ng g ⁻¹)	8.85 ± 1.9	8.77 ± 0.9	7.40 ± 0.8	9.42 ± 1.1	50.49 ± 10.4	± 0.2
SeP (ng g ⁻¹)	268.44 ± 12.7	242.33 ± 18.3	259 ± 15.4	324.9 ± 12.3	328.87 ± 15.6	± 0.7
SeAlb (ng g ⁻¹)	22.7 ± 4.1	20.01 ± 3.1	29.6 ± 3.7	61.23 ± 10.5	± 134.67 ± 8.14	± 1
Semetabolites (ng g ⁻¹)	48.79 ± 2.1	51.46 ± 2.8	74 ± 5	75.36 ± 2	81.87 ± 2.89	± 0.4
Total selenium (ng g ⁻¹)	353.64 ± 18.51	342.57 ± 34.7	388.69 ± 23.5	481.06 ± 34.6	614.68 ± 25.5	± 0.04

Table 4. Quantification of selenium species in mice serum (*Mus musculus*) under different diets.

The majority of Se was associated to SeP followed by GSH-Px and SeAlb. The results show that selenium species were higher in plasma from animals fed with high content Se diet. SeAlb concentration is the more affected by Se-enriched diet although GSH-Px presence in serum is also enhanced by selenium intake. However, the concentration of SeP increases gently with increasing selenium in the diet.

Butler et al. reported a significant increase in the percentage of Se in the albumin fraction of plasma in monkeys supplemented with Se as selenomethionine compared with supplementation of Se as selenite (Buttler et al., 1992). Similarly, the distribution of Se in plasma fractions was investigated in pigs fed various levels of dietary SeMet, where there was a redistribution of Se between various fractions in the blood. On a percentage distribution basis, the Se in SeP decreased, and that in the albumin fraction increased with increased dietary intakes of Se as SeMet (Gu et al., 1998). In humans, increases in the ratios of SeAlb in either the plasma or the albumin fraction also occurred with increases of Se intake of these subjects (Gu et al., 1998).

3.6. Metabolomic study of liver from *Mus musculus* fed with different selenium diets by DI-ESI(±)-QTOF-MS

Liver extracts were analyzed in positive ion mode (ESI+), metabolic profiles exhibited peaks in a wide mass range, from m/z 50 to 1,100. In polar extracts, a large number of signals were observed, with different intensities in the m/z range 50–400; in addition, several clusters of peaks at higher m/z values were also observed, probably associated to structurally related compounds, such as lysophosphatidylcholines (LPCs, m/z 400–600) and phosphatidylcholines (PCs, m/z 750–900). In lipophilic extracts, peak clusters at m/z above 500 were also observed, being remarkable that the number of peaks in these clusters and their intensities increase.

The application of this metabolomic approach to liver extracts, allows discrimination between different groups of animals fed with different selenium diets, using polar metabolites with positive and negative acquisition modes (Figure 4). The involvement of liver in the synthesis of selenoproteins and its relationship to blood plasma composition provides to these results a special interest in health and biomedical fields.

The application of PLS-DA to mass spectra signals from polar and lipophilic metabolites of plasma samples establish a slight separation between exposed and control mice for a wide range of peaks (m/z 50–1,100) using positive and negative acquisition mode.

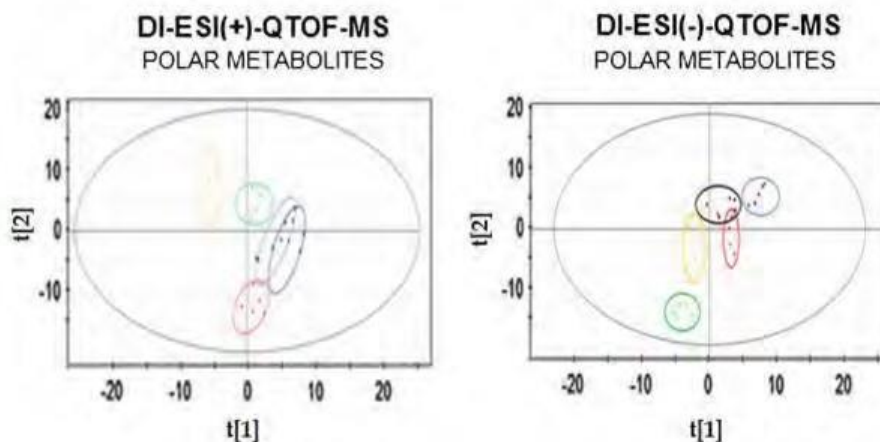


Figure 4. Score plots o PLS-DA for ESI+ and ESI- ionization modes of polar mice liver fed differents doses of Se in diets.

4. Conclusion

In the present study, we have used a mouse model to evaluate the bioavailability of Se from Se-enriched algae based on tissue Se content and the distribution of Se in serum. To exclude limitations of sex hormones, male weanling mice were fed with diets containing different Se levels.

Chlorella sorokiniana rich in proteins and amino acid is a good Se supplementation source, because algae convert selenium mainly into SeMet. To assess Se safety from algae and establish dietary recommendantions for optimal health, estimates of selenium retention and bioavailability from the diet products is essential. Some authors defined bioavailability as the proportion of nutrient that is used for physiological functions and storage, and depends on the transformation in biological active species and tissue accumulation. The retention of Se in tissues is an indirect measure of Se bioavailability. In the present study, we assessed the Se content in liver, kidney and serum samples. Dietary supplementation with Se from algae resulted in a dosedependent increased in tissues.

Consistent with several previous studies, we did not observe a significant effect of dietary Se on growth, even at highest concentration of the Se. We found out that Se supplementation from algae in different concentrations led to a dose-dependent increase in tissue Se contents and Se-containing proteins in serum. In the present study, when mice were fed 0.5 and 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ in the diet, results were in agreement with similar data from rat tissues, namely that there were significant increases in serum, kidney and liver Se concentrations, of the levels observed in mice fed a diet of 0.15 $\mu\text{g Se/kg}$.

It has shown in the number of published studies animals and man that the metabolic fate and physiological function of dietary inorganic selenium may differ from that of SeMet or of food Se. The Se pool consists of SeMet-containing proteins and potentially can contribute to the pool via participation in selenoprotein synthesis. In fact, some autors demonstrated that Se from SeMet,

but not that from selenate or selenocysteine, can be incorporated into albumin. In our study, selenomethionine was the main form of Se in *C. sorokiniana* and the results showed a redistribution of Se between various fractions in the serum. On a percentage distribution basis, the Se in selenoprotein P decreased and in the albumin and GSH-Px fraction increased with increased dietary intakes of Se as algae.

Liver by its high protein turnover is sensitive to concentrations selenium availability (Kipp *et al.*, 2009) and is thus an interesting tissue to study early alterations in metabolism. Changes in metabolites diet with different concentrations of Se were identified by PLS-Da. In next future work will be carried out to identify these metabolites by mass spectrometry/mass to explain selenium induced biochemical pathway alterations.

Acknowledgements

The authors thank the projects CTM2012-38720-C03-01 (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness), P012-FQM-0442 and P09-FQM-04659 (Andalusian Ministry of Economy, Science, and Innovation Consejería de Innovación, Andalusian government). Verónica Gómez Jacinto thanks the Spanish Ministry of economy and competitiveness for a predoctoral scholarship.

References

- 1 Akesson B., & Martensson B. (1991). Chromatography of selenoproteins in human serum using matrix-bound heparin. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 61, 72-76.
- 2 Balogh K., Weber M., Erdélyi M. & Mézes M. (2004). Effect of excess selenium supplementation on the glutathione redox system in broiler chicken. *Acta Veterinaria Hungarica*. 52, 403-411.
- 3 Becker E.W. (2007). Microalgae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. 25, 207-210.
- 4 Behne D., Kyriakopoulos A., Scheid S. & Gessner H. (1991). Effects of chemical form and dosage on the incorporation of selenium into tissue proteins in rats. *Journal of Nutrition*. 121, 806-814.
- 5 Broderick D.J., Deagen J.T. & Whanger P.D. (1987). Properties of glutathione peroxidase isolated from human plasma. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 30, 299-308.
- 6 Bermano G., Nicol F., Dyer J.A., Sunde R.A., Beckett G.J., Arthur J.R. & Hesketh J.E. (1995). Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochemical Journal*. 311, 425-430.

- 7 Butler J.A., Whager P.D., Kaneps A.J. & Patton N.M. (1990). Metabolism of selenite and selenomethionine in the rhesus monkey. *Journal of Nutrition*. 120, 751-759.
- 8 Burk R.F., Hill K.E. & Motley A.K. (2003). Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for SeP. *Journal of Nutrition*. 133, 1517-1520.
- 9 Clark L.C., Combs G.F., Jr. Turnbull, B.W. Slate, E.H. Chalker, D.K. Chow J., Davis L.S., Glover R.A., Graham G.F, Gross E.G., Krongrad A., Leshner J.L. Jr, Park H.K., Sanders B.B. Jr, Smith C.L & Taylor J.R. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional prevention of cancer study group. *Journal of American Medical Association*. 276, 1957-1963.
- 10 Deagen J.T., Butler J.A., Zachara B.A. & Whanger P.D. (1993). Determination of the distribution of selenium between glutathione peroxidase, selenoprotein P, and albumin in plasma. *Analytical Biochemistry*. 208, 176-181.
- 11 Encinar J.R., Schaumlöffel D, Ogra Y. & Lobinski R. (2004). Determination of selenomethionine and selenocysteine in human serum using speciated isotope dilution-capillary HPLC-inductively coupled plasma collision cell mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 76, 6635-6642.
- 12 Fairweather-Tait S.J., Bao Y., Broadley M.R., Collings R., Ford D., Hesketh J.E. & Hurst R. (2011). Selenium in human health and disease. *Antioxidant Redox & Signaling*. 14, 1337-1383.
- 13 Finley J.W. (2006). Bioavailability of selenium from foods. *Nutrition Reviews*. 64, 146-151.
- 14 Flores-Mateo G.F., Navas-Acien A., Pastor-Barriuso R. & Guallar E. (2006). Selenium and coronary heart disease; a meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*. 84, 762-763.
- 15 Gan, L., Liu Q., Xu H.B., Zhu Y.S. & Yang X.L. (2002). Effects of selenium overexposure on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase gene expressions and activities. *Biological Trace Element Research*. 89, 165-175.
- 16 Gao Y., Liu Y., Deng G. & Wang Z. (2004). Distribution of selenium-containing proteins in human serum. *Biol Trace Elem Res*. 100, 105116.
- 17 García-Sevillano M.A., González-Fernández M., Jara-Biedma R., García-Barrera T., López-Barea J., Pueyo C. & Gómez-Ariza J.L. (2012). Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 404, 1967-1981.
- 18 García-Sevillano M.A., García-Barrera T. & Gómez-Ariza J.L. Development of a new column switching method for simultaneous speciation of selenometabolites and selenoproteins in human serum. *Journal of Chromatography A*. 1318, 171-179.
- 19 Gojkovic, Z., Garbayo-Nores, I., Gómez-Jacinto, V., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., Márová I. & Vilchez-Lobato, C. (2013). Continuous

- production of selenomethionine-enriched *Chlorella sorokiniana* biomass in a photobioreactor. *Process Biochemistry*. 48, 1235-1241.
- 20 Gojkovic, Z., Vilchez, C., Torronteras, R., Vigara, J., Gómez-Jacinto, V., Jancer, N., Gómez-Ariza, J.L., Márová I. & Garbayo-Nores, I. (2014). Effect of selenate on viability and selenomethionine accumulation of *Chlorella sorokiniana* grown in a batch culture. *The Scientific Word Journal*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/401265>.
 - 21 Gómez-Jacinto, V., García-Barrera, T., Garbayo, I., Vilchez, C. & Gómez-Ariza, J.L. (2012a). Metallomic study of selenium biomolecules metabolized by the microalgae *Chlorella sorokiniana* in the biotechnological production of functional foods enriched in selenium. *Pure and Applied Chemistry*. 84, 269-280.
 - 22 Gómez-Jacinto, V., García-Barrera, T., Garbayo, I., Vilchez, C. & Gómez-Ariza, J.L. (2012b). Metal metabolomics of microalgae *Chlorella sorokiniana* growing in selenium and iodine enriched media. *Chemická Listy*. 66, 821-828.
 - 23 Gu Q.P., Xia Y.M., Ha P.C., Butler J.A. & Whanger P.D. (1998). Distribution of selenium between plasma fractions in guinea pigs and humans with various intakes of dietary selenium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 12, 8-15.
 - 24 Harr, J.R., Bone, J.F., Tinsley, I.J., Weswig, P.H. & Yamamoto, R.S. Selenium toxicity in rats. II. Histopathology. In: Muth, O. H.; Oldfield, J. E.; Weswig, P. H., eds. Selenium in biomedicine. Westport, CT: AVI Publishing; 1967: 153-178.
 - 25 Harrison H., LITTLEJOHN D. & FELL G.S. (1996). Distribution of Se in human blood plasma and serum. *Analyst*. 121, 189-194.
 - 26 Ip C. & Ganther H.E. (1990). Activity of methylated forms of selenium in cancer prevention. *Cancer Research*. 50, 1206-12011.
 - 27 Jitaru P., Goenaga-Infante H., Vaslin-Reimann S. & Fisicaro P. (2010). Challenges in the accurate speciation analysis of selenium in humans: first report on indicative levels of selenoproteins in a serum certified reference material for total selenium (BCR-637). *Analytica Chimica Acta*. 657, 100-107.
 - 28 Kipp A., Banning A, van Schothorst E.M., Meplan C., Schomburg L., Evelo C., Coort S, Gaj S., Keijer J., Hesketh J. & Brigelius-Flohé R. (2009). Four selenoproteins, protein biosynthesis, and Wnt signalling are particularly sensitive to limited selenium intake in mouse colon. *Molecular Nutrition & Food Research*. 153, 1561-1572.
 - 29 Koller L.D. & Exon J.H (1986). The two faces of selenium-deficiency and toxicity are similar in animals and man. *Canadian Journal Veterinary Research*. 50, 297-306.
 - 30 Maddipati K.R. & Marnett L.J. (1987). Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*. 262, 17398-17403.
 - 31 Martin, J.L. & Hurlbut, J. A. Tissue selenium levels and growth responses of mice fed selenomethionine, Se-meth, high selenium protein or sodium selenite. *Phosphorus Sulfur*. 1, 295-300.

- 32 Mostert V. (2000). Selenoprotein P: properties, functions and regulation. *Archives Biochem Biochemistry Biophysics*. 376, 433-438.
- 33 Neumann P.M., DeSouza M.P., Pickering I.J. & Terry N. (2003). Rapid microalgal metabolism of selenate to volatile dimethylselenide. *Plant, Cell & Environment*. 26, 897-905.
- 34 Pelah D. & Cohen E. (2005). Cellular response of *Chlorella zofingiensis* to exogenous stress. *Plant Growth Regulation*. 45, 225-232.
- 35 Pedrero Z. & Madrid Y. (2009). Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Analytica Chimica Acta*. 634, 135-152.
- 36 Pérez-Enciso M. & Tenenhaus M. (2003). Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach. *Human Genetics*. 112, 581-592.
- 37 Pulz, O. & Gross, W. (2007). Value products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*. 65, 35-648.
- 38 Rayman, M.P. (2000). The importance of selenium to human health. *Lancet*. 356, 233-241.
- 39 Saito Y. Hayashi T., Tanaka A, Watanabe Y., Suzuki M., Saito E. & Takahashi K. (2002). Selenoprotein P in Human Plasma as an Extracellular Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase. Isolation and Enzymatic Characterization of human Selenoprotein P. *J. Biol Chem*. 274, 2866-2871.
- 40 Sariego-Muñiz C., Marchante-Gayón J.M., García-Sevillano J.L. & Sanz Medel A. (2001). Speciation of essential elements in human serum using anion-exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double focusing ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 16, 587-592.
- 41 Spolare, P., Joannis-Cassan, C., Duran E. & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101, 87-96.
- 42 Stengel, D.B, Connan, S. & Popper, Z.A. (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*. 29, 483-501.
- 43 Suzuki K.T. & Ogra Y. (2002). Metabolic pathway for selenium in the body: Speciation by HPLC-ICP-MS with use of enriched Se. *Food Additives & Contaminants*. 19, 974-983.
- 44 Thomson C.D. (1998). Selenium speciation in human body fluids. *Analyst*. 123, 827-831.
- 45 Umysová, D., Vitová M., Doušková, I., Bišová, I.K., Hlavová, M., Čížková, M., Machát, J., Doucha, J. & Zachleder, V. (2009). Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *BMC Plant Biology*. 9, 58-74.

Conclusiones / Conclusions

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten alcanzar las siguientes conclusiones:

1. Los cultivos de *Chlorella* absorben el yodo a partir del medio cuando está presente en forma de yoduro y el contenido que retienen depende de su concentración en el medio, lo cual pone de manifiesto que la microalga puede ser utilizada para la acumulación de yodo. La aplicación de un procedimiento de extracción y fraccionamiento del extracto de *Chlorella*, combinado con la aplicación de un procedimiento metalómico mediante el acoplamiento de la cromatografía de exclusión de tamaño con un sistema de detección atómica ICP-MS, para la caracterización de especies de yodo en *Chlorella*, proporciona una herramienta útil para la evaluación de la respuesta biológica a yodo en la microalga. Los perfiles obtenidos a partir de los extractos solubles en agua, muestran varias biomoléculas unidas a yodo, pudiéndose relacionar uno de los picos con T3 por su tiempo de retención con el patrón. Asimismo, se ha desarrollado un procedimiento basado en el uso de un sistema cromatográfico bidimensional, SEC-AEC, acoplado al ICP-MS para la identificación de biomoléculas unidas a yodo de bajo peso molecular. El 66% del yodo en dicha fracción soluble se distribuye principalmente entre yoduro (75%) y yodato (25%). El estudio metalómico se realizó también en la fracción macromolecular del alga. Los cromatogramas revelan biomoléculas que contienen yodo de alta masa molecular.
2. Se han conseguido establecer las condiciones experimentales para el enriquecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en selenio. Estos microorganismos han demostrado un elevado potencial para acumular y biotransformar selenio durante la exposición de selenato en el medio de cultivo. Los análisis de especiación indican que la microalga transforma el selenato del medio de cultivo principalmente a SeMet, estando también presente en el alga los compuestos SeCys₂, SeMeSeCys siendo estos compuestos de Se de gran importancia por ser considerados agentes antioxidantes y anticancerígenos. Se ha desarrollado una estrategia biotecnológica para estimar la incorporación de Se mediante carencia de azufre en el medio de cultivo del microorganismo. Los datos obtenidos en este ensayo revelan un aumento en la concentración de Se en condiciones deficientes de azufre. Estos trabajos pueden considerarse como un primer paso para estudios futuros con el fin de obtener

alimentos funcionales que permitan disminuir la deficiencia de Se en humanos y animales.

3. Los experimentos de exposición de la microalga *Chlorella* a Hg permiten obtener información de los mecanismos biológicos provocados por la presencia de Hg en el citado microorganismo. La microalga presenta una alta tolerancia a Hg, siendo la concentración subletal de este elemento de 5 mgL⁻¹. Se ha desarrollado un procedimiento metalómico basado en el uso de un sistema cromatográfico bidimensional, SEC-RPC, acoplados a un sistema de detección elemental, ICP-MS, y en paralelo con un sistema de detección molecular, ESI-qTOF-MS, que permitió la identificación de dos fitoquelatinas de mercurio en el alga, (des-Gly)PC₂Hg y PC₂Hg. La exposición de Hg provoca un incremento de un 60% en la señal de un pico trazado por Cu, que puede ser relacionado con mioglobina y un aumento de la señal correspondiente a Hg-MT, así como la síntesis biológica de Cu-Hg, Zn y Hg-GSH.
4. La aplicación de un método de multiespeciación de Se y Hg mediante un acoplamiento de columnas cromatográficas (column switching) hace posible el estudio de las interacciones entre el Hg y el Se en cultivos de *Chlorella*, con especial atención en el posible efecto de la quiralidad de la SeMet. Los resultados bioquímicos muestran evidencias del efecto protector de la SeMet frente a la acción perjudicial del MeHg⁺, al mejorar los parámetros indicadores de la viabilidad del cultivo en aquellos que fueron pretratados con SeMet respecto a los cultivos no pretratados. Los análisis de especiación permiten concluir que la especie D-SeMet no participa en el proceso de protección/desintoxicación del MeHg⁺, ya que es asimilada y transformada por la microalga en otros metabolitos.
5. Se ha conseguido estimular la acumulación de Se en la forma química bioactiva SeMet, tras la adición del Se en la forma de selenato sódico una vez que la microalga ha alcanzado su fase de crecimiento exponencial y aumentando el tiempo de exposición a la microalga de selenato en el medio, consiguiendo una biomasa con alto contenido de Se (355±8 µg·g⁻¹).
6. Se ha determinado que el 81% del selenio total presente en la microalga *Chlorella* enriquecida en Se es bioaccesible tras una digestión gastrointestinal *in vitro*. Los resultados mediante la

aplicación de cromatografía SEC revelan la hidrólisis de proteínas y biomoléculas de Se de alta masa molecular a selenocompuestos de baja masa molecular. Los análisis mediante RP mostraron que el Se bioaccesible es principalmente SeMet (79% del Se total).

7. Los resultados de la experiencia con ratones *Mus musculus* alimentados con microalgas *Chlorella* enriquecida en Se, revelan que la mayor parte del Se se encuentra en el suero del ratón en forma de SeP. El aumento de la ingesta de Se, produjo una disminución en el porcentaje de Se en los niveles de SeP, mientras que los niveles de GPx y SeAlb se incrementaron. Los resultados del análisis metabolómico de los extractos de hígados permitió una clasificación de los animales según la dieta ingerida, reflejando cambios en las rutas metabólicas por la ingesta de Se.

The results obtained in the present study allow us to set the following conclusions:

1. *Chlorella* cultures absorb iodine from the medium containing iodide. Suitable conditions for the accumulation of iodine in *Chlorella* are depending on iodine concentration in the culture medium. The application of extraction and fractionation procedures combined with the use of a metallomic procedure, based on size exclusion chromatography coupled to ICP-MS, for the characterization of iodine species in *Chlorella*, provides a useful approach to assess the biological response of microalgae to iodine exposure. The iodine profiles obtained from water-soluble fraction show several biomolecules bound to iodine, being able to relate one of the peaks with T3 by its retention time with the standard. In addition, a method has been developed on the basis of a two-dimensional chromatographic system, SEC-ACS, coupled to ICP-MS for the identification of biomolecules linked to iodine of low molecular mass. Water-soluble fraction contains 66% of iodine mainly distributed between I⁻ (75%) and IO₃⁻ (25%). A metallomic study was also performed on the macromolecular fraction of the algae. The chromatograms reveal biomolecules of iodine containing high molecular mass.
2. The experimental conditions for selenium enrichment of microalgae *Chlorella sorokiniana* have been established. These microorganisms have shown a high potential to accumulate selenium by biotransformation of selenite to other species. Speciation analysis shows that selenate is biotransformed mainly SeMet, although SeCys₂ and SeMeSeCys are also present. This fact has a great importance because these compounds are considered as antioxidant and anticancer agents. It has been developed a biotechnologic strategy to enhance the accumulation of selenium in the algae under sulfur deficiency in the culture medium. The data obtained in this study show an increase in the concentration of Se in sulfur deficient conditions. These works can be seen as a first step for future studies in order to obtain functional foods to reduce Se deficiency in humans and animals.
3. Exposure experiments of microalgae *Chlorella* to Hg allows getting a better understanding about the biological toxicity mechanisms triggered by Hg on this microorganism. The microalga has a high tolerance to Hg, which exhibits a sublethal concentration of 5 mg·L⁻¹. A metallomic procedure based on a

two-dimensional chromatography approach, size exclusion followed by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC), combined in parallel with inductively coupled plasma octopole reaction cell mass spectrometry (ICP-ORS-MS) and spray ionization time-of-flight mass spectrometry (ESI-QTOF-MS) has been developed, which allowed the identification of two phytochelatins of mercury in the algae, (des-Gly)PC₂Hg and PC₂Hg. Mercury exposure causes an increase of 60% in the chromatographic peak a peak signal traced by Cu, which may be related to an increase of myoglobin and an increase of the signal corresponding to Hg-MT, as well as, the biological synthesis of Cu-Hg, Zn and Hg-GSH.

4. The application of a multiespeciation method for Se and Hg by coupling chromatographic columns (column switching) makes it possible the study of Hg and Se in the cultures of *Chlorella*, with special attention to the possible effect of the chirality of SeMet. Biochemical results show evidences of the protective effect of SeMet against the harmful action of MeHg⁺, since this Se-specie improves the parameters related to colony viability with respect to the culture non pre-treated with SeMet and exposed only MeHg⁺. The speciation analysis allows concluding that D-SeMet species do not participate in the process of protection/detoxification against MeHg⁺, as it is assimilated and transformed by the microalgae in other metabolites.
5. It has been achieved the accumulation of bioactive selenium chemical form SeMet, after addition of Se in the form of sodium selenate once the microalgae has reached the exponential growth phase and increasing the exposition time, achieving a high biomass content of Se (355±8 µg·g⁻¹).
6. It has been established that 81% of selenium present in *Chlorella* enriched in selenium is bioavailable after in vitro gastrointestinal digestion. Results of Se molecular fractions by size exclusion chromatography revealed that high molecular weight Se-containing molecules were hydrolized to low molecular weight selenocompounds. Our results show that Se speciation by reversed phase in the gastrointestinal extract was dominated by the presence of SeMet, which represented 79% of total Se.

7. The results from *Mus musculus* fed with micralgae *Chlorella* enriched in Se reveal that most of Se is present in mice serum as SeP. The increase of Se in the diet produces the reduction of Se associated to SeP, while levels of GPx and SeAlb increase. The results of metabolomic analysis in liver extracts allows classify the animals according to the diet, which reflect changes in metabolomic pathways associated to Se intake.

Bibliografía

A **ESAN** (Spanish Agency of Food Security and Nutrition).

Nutritional evaluation of Spanish diet II. Micronutrients. National Survey of Dietetic Intake (ENIDE). Ministry of Health: Spain, 2001.

Ahsan, U., Kamran, Z., Raza, I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M.H. & Iqbal, Z. 2014. Role of selenium in male reproduction-A review. *Animal Reproduction Science*. 146:55-66.

Akakabe, Y., Matsui, K. & Kajiwara, T. 2003. 2,4-Decadienals are produced via. (R)-11-HPITE from arachidonic acid in marine green alga *Ulva conglobata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 11:3607-3609.

Akhtar, N., Iqbal, J. & Iqbal, M. 2004. Removal and recovery of nickel (II) from aqueous solution by loofa sponge immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies. *Journal of Hazardous Materials*. 108:85-94.

Amaro, H.M., Barros, R., Guedes, A.C., Sousa-Pinto, I. & Malcata, F.X. 2013. Microalgal compounds modulate carcinogenesis in the gastrointestinal tract. *Trends in Biotechnology*. 31:92-98.

Amaro, H.M., Guedes, A.C. & Malcata, F.X. 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*. 88:3402- 3410.

Anawar, H.M. 2008. Arsenic speciation in environmental samples by hydride generation and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*. 88:30-42.

Anjos, M., Fernandes, B.D., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. & Dragone, G. 2013. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. 139:149-154.

Arai, S. & Shiraiwa, Y. 2009. Selenium utilization strategy by microalgae. *Molecules*. 14:4880-4891.

Arai, S., Osawa, T., Ohigashi, H., Yoshikawa, M., Kaminogawa, S., Watanabe, M., Ogawa, T., Okubo, K., Watanabe, S., Nishino, H., Shinohara, K., Esashi, T. & Hirahara, T. 2009. A mainstay of functional food science in Japan. History, present status, and future Outlook. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 65:1-13.

Arnér, E.S.J. 2010. Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine?. *Experimental Cell Research*. 316:1296-1303.

Artursson, P., Palm, K. & Luthman, K. 2012. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64:280–289.

Aureli, F., Ouerdane, L., Bierla, K., Spuznar, J., Tejo Prakash & Cubadda, F. 2012. Identification of selenosugars and other low-molecular weight selenium metabolites in high-selenium cereal crops. *Metallomics*. 4:968–978.

Barrow, C. & Shahidi, F. Marine nutraceuticals and functional foods. *CRC Press, Taylor and Francis Group*. 2008.

Bashan, L.E. & Bashan, Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresour Technology*. 10:1611-1627.

Basu, T.K. & Donaldson, D. 2008. Intestinal absorption in health and disease: micronutrients. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 17:957-979.

Bathia, P., Aureli, F., D'Amato, M., Prakash, R., Cametra, S.H., Nagaraja, T.P. & Cubadda, F. 2013. Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified *Pleurotus* mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. *Food Chemistry*. 140:225-230.

Bayramoğlu, G., Tuzun, I., Celik, G., Yilmaz, M. & Arica, M.Y. 2006. Biosorption of mercury (II), cadmium (II) and lead (II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. *International Journal of Mineral Processing*. 81:35-43.

Becker, E.W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition. En: *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Richmond A (Ed). London: Blackwell Science. 312-351.

Becker, E.W. 2007. Microalgae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. 25:207-210.

Beckett, G.J. & Arthur, J.R. 2005. Selenium and endocrine systems. *Journal of Endocrinology*. 184:455-465.

Behne, D., Kyriakopoulos, A., Kalcklösch, M., Weiss-Nowak, C., Pfeifer, H., Gessner, H. & Hammel, C. 1997. Two new selenoproteins

found in the prostatic glandular epithelium and in the spermatid nuclei. *Biomedical and Environmental Sciences*. 10:340-345.

Belasco, W. 1997. Algae burgers for a hungry world? The rise and fall of the *Chlorella cuisine*. *Technology and Culture*. 38:608-634.

Belay, A. 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Physiology*. 5:235-240.

Ben-Amotz, A. & Avron, M. 1990. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends in Biotechnology*. 8:121-126.

Bennet, W. 1998. Assessment of selenium toxicity in algae using turbidostat culture. *Water Research*. 22:939-942.

Berr, C., Balansard, B., Arnaud, J., Roussel, A.M., & Alpérovitch A. 2000. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. Etude du Vieillissement Artériel. *Journal of the American Geriatrics Society*. 48:1285-1291.

Berry M.J., Banu L., Chen Y., Mandel S.J., Kieffer J.D., Harney J.W., Larsen P.R. 1991. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature*. 353:273-276.

Berry, M.J., Banu, L. & Larsen, P.R. 1991. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature*. 349:438-440.

Bertini, I. & Cavallaro, G. 2008. Metals in the "omics" world: copper homeostasis and cytochrome c oxidase assembly in a new light. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 13:3-14.

Bettmer, J. 2005. Metalloproteomics: a challenge for analytical chemists. *Analytical and Bioteanalytical Chemistry*. 383:370-371.

Bettmer, J., Montes Bayon, M., Ruiz Encinar, J., Fernández Sánchez, M.R., Fernández de la Campa M.R. & Sanz Medel, A. 2009. The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. *Journal of Proteomics*. 72:989-1005.

Beyrouy, P. & Chan, H.M. 2006. Co-consumption of selenium and vitamin E altered the reproductive and developmental toxicity of methylmercury in rats. *Neurotoxicology and Tetratology*. 28:49-58.

Bhattacharya, I.D., Picciano, M.F. & Milner, J.A. 1988. Characteristics of human milk glutathione peroxidase. *Biological Trace Element Research*. 18:59-70.

Birringer, M., Pilawa, S. & Flohe, L. 2002. Trends in selenium biochemistry. *Natural Products Report*. 19:693-718.

Bluhm, K., Croot, P., Wuttig, K. & Lochte, K. 2010. Transformation of iodate to iodide in marine phytoplankton driven by cell senescence. *Aquatic Biology*. 11;1-15.

Bölling, C. & Fiehn, O. 2005. Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation. *Plant Physiological*. 139:1995-2005.

Borowitzka, M.A. 2013. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Physiology*. 3:743-756.

Bottino, N.R., Banks, C.H., Irgolic, K.J., Micks, P., Wheeler, AE & Zingaro, RA. 1984. Selenium containing amino acids and proteins in marine algae. *Phytochemistry*. 23:2445-2452.

Bouarab, K., Adas, F., Gaquerel, E., Kloareg, B., Salaün, J.P., Potin, P. 2004. The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. *Plant Physiology*. 135:1838-1848.

Brennan, L. & Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable Sustainable Energy Reviews*. 14:557-577.

Brigelius-Flohé, R. 1999. Tissue specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine*. 27:951-965.

Burianová, I., Machát, J., Niedobová, E. & Doucha, J. 2005. Fractionation of iodine in iodine-enriched algae *Chlorella*. *Chemické Listy*. 14:273-276.

Butcher, D.J. 2007. Environmental applications of arsenic speciation using atomic spectrometry detection. *Applied Spectroscopy Reviews*. 42:1-22.

C

abañero, A.I., Madrid, Y. & Cámara, C. 2004. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: An in vitro digestion method. *Analytica Chimica Acta*. 526:51-61.

Cabañero, A.I., Madrid, Y. & Cámara, C. 2006. Selenium long-term administration and its effect on mercury toxicity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 54:4461-4468.

- Calle-Gutiñas, M.B., Bordin, S. & Rodriguez, A.R. 2002.** Identification, characterization and determination of metal-binding proteins by liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 374:369-378.
- Campos, M.L., Farrenkopf, A.M., Jickells, T.D. & Luther, G.W. 1996.** A comparison of dissolved iodine cycling at the Bermuda Atlantic time-series station and the Hawaii timeseries station. *Deep-Sea Research*. 43:455-466.
- Cao, X., Jiang, X., Kareem, A., Dou, Z.H., Abdul-Rakeman, M., Zhang, M.L., Ma, T., O'Donnell, K., DeLong, N. & DeLong, G.R. 1994.** Iodination of irrigation water as a method of supplying iodine to a severely iodine-deficient population in Xinjiang, China. *Lancet*. 344:107-110.
- Castellano, S. 2009.** On the unique function of selenocysteine- Insights from the evolution of selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1970:1463-1470.
- Castrillo, J.I., Hayes, A., Mohammed, S., Gaskell, S.J. & Oliver, S.G. 2003.** An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Plant Metabolomics*. 62:929-937.
- Cazale, A.C. & Clemens, S. 2001.** *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatase. Evolution and function of phytochelatase synthases. *FEBS Letters*. 507:215-219.
- Chan, Q. & Caruso, J.A. 2012.** A metallomics approach discovers selenium-containing proteins in selenium-enriched soybean. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 403:1311-1321.
- Chance, R., Malin, G., Jickells, T. & Baker, A.R. 2007.** Reduction of iodate to iodide by cold water diatom cultures. *Marine Chemistry*. 105:169-180.
- Chassaigne, H., Vacchina, V. & Lobinski, R. 2000.** Elemental speciation analysis in biochemistry by electrospray mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*. 19: 300-311.
- Chisti, Y. 2007.** Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25: 294-306.
- Choi, Y.E., Yun, Y.S., Park, J.M. & Yang, J.W. 2011.** Determination of the time transferring cells for astaxanthin production considering two-stage process of *Haematococcus pluvialis* cultivation. *Bioresource Technology*. 24:11249-112953.

Clark, L.C., Combs, G.F. & Turnbull, B.W. 1996. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *Journal American Medical Association*. 276:1957-1963.

Clarkson, T.W. & Magos, L. 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical Reviews in Toxicology*. 36:609-662.

Clemens, S. 2006. Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology*. 163:319-332.

Cobbett, C.S. 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current opinion in Plant Biology*. 3:211-216.

Cocho, J.A. Selenio: conocimiento actual y situación en España. [online] <http://www.seqc.es/article/view/66/1/23>.

Combs, F.G. & Junxuan, L. 2001. Selenium, its molecular biology and role in human health. En: Pharmacology & Therapeutics. Hatfield D.L. (Ed). Kluwer Academic Publishers, Boston: 79: 205-217.

Corvilain, B., Van Sande, J., Laurent, E. & Dumont, J.E. 1991. The H₂O₂ generating system modulates protein iodination and the activity of the pentose phosphate pathway in dog thyroid. *Endocrinology*. 128:779-785.

Cowan J.A. Inorganic Biochemistry. An Introduction. Willey-VCH, New York, 1997.

Cuaresma, M., Janssen, M., Vilchez, C. & Wijffels, R.H. 2009. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. *Biotechnology Bioengineering*. 104:352-359.

Culvin-Aralar, L.A. & Furness, R.W. 1991. Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 21:348-364.

D

'Souza, SF. 2001. Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 16:337-353.

Dai, G., Levy, O. & Carrasco, N. 1996. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*. 379:458-460.

- De La Cuesta, J.L. & Manley, S.L. 2009.** Iodine assimilation by marine diatoms and other phytoplankton in nitrate-replete conditions. *Limnology and Oceanography*. 54:1653-1664.
- Del Campo, J.A., García-González, M. & Guerrero, M.G. 2007.** Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74:1163-1174.
- Dembitsky, V.M. & Srebnik, M. 2002.** Natural halogenated fatty acids: their analogues and derivatives. *Progress in Lipid Research*. 41:315-367.
- Dembitsky, V.M., Rezanková H., Rezanka T. & Hanuš, L.O. 2003.** Variability of the fatty acids of the marine green algae belonging to the genus *Codium*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 31:1125-1145.
- Demirci, A. & Pometto, A.L. 1999.** Production of organically bound selenium yeast by continuous fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47:2491-2495.
- Demming-Adams, B. & Adams, W.W. 2002.** Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*. 298: 2149-2153.
- Deng, R. & Chow, T.J. 2010.** Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics*. 4:33-45.
- Dernovics, M. & Lobinski, R. 2008.** Characterization of the selenocysteine containing metabolome in selenium rich yeast: Part 1. Identification of new species by multidimensional liquid chromatography with parallel ICP-MS and electrospray Q-TOF-MS/MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 23:72-83.
- Dernovics, M., García-Barrera, T., Bierla, K., Preud´homme, H. & Lobinski, R. 2007.** Standarless identification of selenocystathione and its c-glutamyl derivatives in monkeypot nuts by 3D liquid chromatography with ICP-MS detection followed by nanoHPLC-Q-TOF-MS/MS. *Analyst*. 132:439-449.
- Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. 2000.** National Academy of Sciences. Institute of Medicine. *Food and Nutrition Board*.
- Dietz, R., Riget, F. & Born, E.W. 2000.** Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Science of the Total Environment*. 245:1-5.

Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Borne, F., Fern, E.B. & Roberfroid, M.B. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*. 81: 1-27.

Dittami, S.M., Gravot, A., Renault, D., Goulet, S., Eggert, A., Bouchereau, A., Boyen, C. & Tonon, T. 2011. Integrative analysis of metabolite and transcript abundance during the short-term response to saline and oxidative stress in the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant, Cell & Environment*. 34:629–642.

Dodig, S. & Cepelak, I. 2004. The facts and controversies about selenium. *Acta Pharmaceutica*. 54: 261-276.

Dos Santos, A.P., Mateus, M.L., Carvalho, C.M. & Batoreu, M.C. 2007. Biomarkers of exposure and effect as indicators of the interference of selenomethionine on methylmercury toxicity. *Toxicology Letters*. 169:121-128.

Doucha, J., Lívanský, K., Kotrbáček, V. & Zachleder, V. 2009. Production of *Chlorella* biomass enriched by selenium and its use in animal nutrition: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83:1001-1008.

Drash, G., Wanghofer, E., Roeder, G. & Stobach, S. 1996. Correlation of mercury and selenium in the human kidney. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 10: 251–254.

Duerr, E.O., Molnar, A. & Sato, V. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *Marine Biotechnology*. 75: 65-70.

Dumont, E., De Cremer, K., Hulle, M.V., Chéry, C.C., Vanhaecke, F. & Cornelis, R. 2005. Identification of the major selenium compound, Se-Methionine, in three yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) dietary supplements by on-line narrowbore liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1071: 191-196.

Dumont, E., Vanhaecke, F. & Cornelis, R. 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 385:1304-1323.

Dumont, J.E., Lamy, F., Roger, P. & Maenhaut, C. 1992. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiological Reviews*. 72:667-697.

Dunn, W.B. & Ellis, D.I. 2005. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*. 24:285-294.

Eales, J.G. 1997. Iodine metabolism and thyroid-related functions in organisms lacking thyroid follicles: are thyroid hormones also vitamins? *Proceedings of the Society for Experiments Biology and Medicine*. 214:302-317.

Edmonds, J.S. & Francesconi, K.A. 1987. Transformation of arsenic in the marine environment. *Experientia*. 43:553-557.

Edmonds, S.J. & Morita, M. 1998. The determination of iodine species in environmental and biological samples. *Pure & Applied Chemistry*. 70:1567-1584.

El-Sharaky, A.S., Newairy, A.A., Baldredeen, M.M., Eweda, S.M. & Sheweita, S.A. 2007. Protective role of selenium against renal toxicity induced by cadmium in rats. *Toxicology*. 235:185-193.

Eltom, M., Elnagar, B., Sulieman, E.A., Karlsson, F.A., Van Thi, H.V., Bourdoux, P. & Gebre-Medhin, M. 1995. The use of sugar as a vehicle for iodine fortification in endemic iodine deficiency. *International Journal Food Sciences and Nutrition*. 46:281-289.

Encinar, J.R., Ouerdane, L., Buchmann, W., Tortajada, J., Lobinski, R. & Spuznar, J. 2003. Identification of water-soluble selenium-containing proteins in selenized yeast by size-exclusion-reversed-phase HPLC/ICPMS followed by MALDI-TOF and electrospray Q-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 75:3765-3774.

Escanero, J.F. 1998. Aspectos Bioquímicos, Analíticos y Clínicos. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular.

Eto, K. 1997. Pathology of Minamata Disease. *Toxicologic Pathology*. 25:614-623.

Fang, S.C. 1977. Interaction of selenium and mercury in the rat. *Chemico - Biological Interactions*. 17:25-40.

Farina, M, Rocha, J.B.T. & Aschner, M. 2011. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sciences*. 89:555-563.

Feng, P, Deng, Z, Hu, Z & Fan, L. 2011. Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. *Bioresource Technology*. 102:10577-10584.

Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N., Willmitzer, L. 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*. 18:1157-1161.

Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T. & Falkowski, P. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*. 281:237-240.

Finley, J.W. 2006. Bioavailability of selenium from foods. *Nutrition Reviews*. 64:146-151.

Flatt, T., Moroz, L.L., Tatar, M. & Heyland, A. 2006. Comparing thyroid and insect hormone signaling. *Integrative and Comparative Biology Reviews*. 46:777-794.

Fournier, E., Adam-Guillermin, C., Potin-Gautier, M. & Pannier, F. 2010. Selenate Bioaccumulation and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Influence of ambient sulphate ion concentration. *Aquatic Toxicology*. 97:51-57.

Francesconi, K.A., Kuehnelt, D. 2004. Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst*. 129:373-395.

Fries, L. 1966. Influence of iodine and bromine on growth of some red algae in anoxic culture. *Physiological Plant*. 19:800-808.

Fuse, H., Takimura, O. & Yamaoka, Y. 1989. Effects of iodide and iodate ions on marine phytoplankton. *Biology, Environmental science and toxicology*. 229-232.

G

ailier, J. 2007. Arsenic-selenium and mercury-selenium bonds in biology. *Coordination Chemistry Reviews*. 251:234-254.

Gailer, J., George, G.N., Pickering, I.J., Madden, S., Prince, R.C., Yu, E.Y., Denton, H.S., Younis, H.S. & Aposhian, H.V. 2000. Structural basis of the antagonism between inorganic mercury and selenium in mammals. *Chemical Research in Toxicology*. 13:1135-1142.

Gammelgaard, B., Sturup, S. & Vinther, C.M. 2012. Human urinary excretion and metabolism of ⁸²Se-enriched selenite and selenite determined by LC-ICP-MS. *Metallomics*. 4:149-155.

- Ganther, H.E. 1999.** Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*. 20:1657-1666.
- Ganther, H.E., Goudie, C., Kopecky, M.J., Wagner, P., Oh, S.H. & Hoekstra W.G. 1972.** Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science*. 172:1122-1124.
- Gaquerel, E., Hervé, C., Labrière, C., Boyen, C., Potin, P. & Salaün, J.P. 2007.** Evidence for oxylipin synthesis and induction of a new polyunsaturated fatty acid hydroxylase activity in *Chondrus crispus* in response to methyljasmonate. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1771: 565–575.
- García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., González-Fernández, M., Moreno, F., García-Sevillano, M.A. & Gómez Jacinto, V. 2012.** Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 403:2237–2253.
- García-González, M., Moreno, J., Cañavate, J.P., Anguis, V., Prieto, A., Manzano, C., Florencio, F.J. & Guerrero, M.G. 2003.** Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern of Spain. *Journal of Applied Phycology*. 15:177-184.
- García-Satal, C., Taebunpakul, S., Stokes, E., Barciela-Alonso, M.C., Bermejo-Barrera, P., Goenaga-Infante, H. 2012.** Two-dimensional HPLC coupled to ICP-MS and electrospray ionisation (ESI)-MS/MS for investigating the bioavailability in vitro of arsenic species from edible seaweed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 402: 3359-3369.
- Garnham, G.W., Codd, G.A. & Gadd, G.M. 1992.** Accumulation of cobalt, zinc and manganese by the estuarine green microalga *Chlorella salina* immobilized in alginate microbeads. *Environmental Science & Technology*. 26:1764-1770.
- Garnham, G.W., Codd, G.A. & Gadd, G.M. 1992.** Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 37:270-276.
- Ge, R., Sun, X. & He, Q.Y. 2011.** Overview of the metallometabolomic methodology for metal-based drug metabolism. *Current Drug Metabolism*. 12:287-299.
- Geiszinger, A., Goessler, W., Pedersen, S.N. & Francesconi, K.A. 2001.** Arsenic biotransformation by the brown macroalga *Fucus serratus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20:2252-2262.

Gelpi, E. 2002. Interfaces for coupled liquid-phase separation/mass spectrometry techniques. An update on recent developments. *Journal of Mass Spectrometry*. 37:241-253.

Geoffroy, L., Gilbin, R., Simon, O., Floriani, M., Adam, C., Pradines, C., Cournac, L. & Garnier-Laplace, J. 2007. Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*. 83:149-158.

Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Naseri, A.T., Montazeri-Najafabady, N., Mobasher M.A. & Dabbagh, F. 2012. Microalgae biofuel potentials. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 48:150-68.

Gimferrer, N. Microalgas, más que un microorganismo. Eroski consumer (www.consumer.es).

Gin, K.Y., Tang, Y.Z. & Azid, M.A. 2002. Derivation and application of a new model for heavy metal biosorption by algae. *Water Research*. 36:1313-1323.

Giovannucci, E. 1998. Selenium and risk of prostate cancer. *Lancet*. 5:775-756.

Giusti, P., Lobinski, R., Spuznar, J. & Schaumlöffel, D. 2006. Development of a Nebulizer for a Sheathless Interfacing of NanoHPLC and ICPMS. *Analytical Chemistry*. 78:965-967.

Gladyshev, V.N., Factor, V.M., Housseau, F. & Hatfield, D.L. 1998. Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 251:488-493.

Glahn, R.P., Wien, E.M., Van Campen, D.R. & Miller, D.D. 1996. Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels in vivo studies: Use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability. *Journal of Nutrition*. 126:332-339.

Goglia, F., Silvestri, E. & Lanni, A. 2002. Thyroid hormones and mitochondria. *Bioscience Reports*. 22:1732.

Gojkovic, Z., Garbayo-Nores, I., Gómez-Jacinto, V., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., Márová, I. & Vílchez-Lobato, C. 2013. Continuous production of selenomethionine enriched *Chlorella sorokiniana* biomass in a photobioreactor. *Process Biochemistry*. 48:1235-1241.

Gojkovic, Z., Vílchez, C., Torronteras, R., Vígara, J., Gómez-Jacinto, V., Janzer, N., Gómez-Ariza, J.L., Márová, I. & Garbayo-

Nores, I. 2014. Effect of selenate on viability and selenomethionine accumulation of *Chlorella sorokiniana* grown in batch culture. *The Scientific World Journal*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/401265>.

Gómez-Ariza, J.L., García Barrera, T., Lorenzo, F. & Arias, A. 2005. Analytical characterization of bioactive metal species in the celular domain (metallomics) to simplify environmental and biological proteomics. *International Journal Environmental Analytical Chemistry*. 85:255-266.

Gómez-Ariza, J.L., García Barrera, T., Lorenzo, F., Bernal, V., Villega, M.J. & Oliveira, V. 2004. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. *Analytica Chimica Acta*. 524:15-22.

Gómez-Ariza, J.L., Morales, E., Giráldez, I., Sánchez-Rodas, D. & Velasco, A. 2001. Sample treatment in chromatography based speciation of organometallic pollutants. *Journal of Chromatography A*. 938:211-224.

Gómez-Jacinto, V., Arias-Borrego, A., García Barrera, T., Garbayo, I., Vilchez, C. & Gómez-Ariza, J.L. 2010. Analytical characterization of bioactive metal species in the celular domain (metallomics) to simplify environmental and biological proteomics. *Pure and Applied Chemistry*. 82:473-481.

Gonick H.C. 2011. Lead-Binding Proteins: A Review. *Journal of Toxicology*. 2011; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/401265>.

González-Fernández, M., García-Barrera, T., Jurado, J., Prieto-Álamo, M.J., Pueyo, C., López-Barea, J. & Gómez-Ariza, J.L. 2008. Integrated application of transcriptomics, proteomics, and metallomics in environmental studies. *Pure and Applied Chemistry*. 80:2609-2626.

Goultquer, S., Ritter, A., Thomas, F., Ferec, C., Salaün, J.P. & Potin, P. 2009. Release of volatile aldehydes by the brown algal kelp *Laminaria digitata* in response to both biotic and abiotic stress. *ChembioChem*. 10:977-982.

Gouveia, L., Batista, A.P., Miranda, A., Empis, J. & Raymundo, A. 1997. *Chlorella vulgaris* bioamass used as colouring source in traditional butter cookies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8:433-436.

Grant, I.D., Wuilloud, R.G., Wuilloud, J.C. & Caruso, J.A. 2004. Investigation of the elemental composition and chemical association of several elements in fulvic acids dietary supplements by size-exclusion chromatography UV inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1054:313-319.

Gravot, A., Dittami, S.M., Rousvoal, S., Lugan, R., Eggert, A., Collén, J., Boyen, C., Bouchereau, A. & Tonon, T. 2010. Diurnal oscillations of metabolite abundances and gene analysis provide new insights into central metabolic processes of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *New Phytologist*. 188:98–110.

Gribble, G.W. 2003. The diversity of naturally produced organohalogenes. *Chemosphere*. 52: 289-297.

Grill E. 1985. Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*. 230:674-676.

Grobbelaar, J.U. 2010. Microalgal biomass production: challenges and realities. *Photosynthesis Research*. 106:135-144.

Guevara, M., Bastardo, L., Cortez, R., Arredondo-Vega, B., Romero, L. & Gómez, P. 2011. *Rhodomonas salina* (Cryptophyta) pastes as feed for *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Revista de Biología Tropical*. 59:1503-1515.

Gupta, V.K., Shrivastava, A.K. & Jain, N. 2001. Biosorption of chromium (VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species. *Water Research*. 35:4079-4085.

Gutiérrez, J.C., Díaz, S., Martín-González, A. & Ortega, R. 2003. Ciliates as a potential source of cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution. *European Journal of Protistology*. 39:461-467.

Haldimann, M., Alt, A., Blanc, A. & Blondeaue, K. 2005.

Iodine content of food groups. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18,461-471.

Halim, R., Danquah, M.K. & Webley, P.A. 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*. 30:709-732.

Hamano-Nagaoka, M., Hanaoka, K., Usui, M., Nishimura, T., Maitani, T. 2008. Nitric acid-based partial-digestion method for selective determination of inorganic arsenic in hijiki and application to soaked hijiki. *Journal of the Food Hygiene Society of Japan*. 49:88-94.

Han, X., Wong, Y.S., Wong, M.G. & Tam, N.F.Y. 2007. Biosorption and bioreduction of Cr(VI) by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. *Journal of Hazardous Materials*. 146:65-72.

Harrington, C.F., Vidler, D.S., Jenkins, R.O., Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O. 2010. Analysis of organometal(loid) compounds in environmental and biological samples, Organometallics in environment and toxicology, Metal ions in life sciences.7.

Hawkes, W.C. & Hornbostel, L. 1996. Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. *Biological Psychiatry*. 39:121-128.

Hawkes, W.C. & Turek, P.J. 2001. Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. *Journal of Andrology*. 22:764-772.

Henley, W.J., Hironaka, J.L., Guillou, L., Buchheim, M.A., Buchheim, J.A., Fawley, M.W. & Fawley, K.P. 2004. Phylogenetic analysis of the “*Nannochlorislike*” algae and diagnoses of *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*. 43:641-652.

Heumann, K.G. 1992. Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) of the elements. *Journal of Mass Spectrometry*. 11:41-67.

Hill, V.L. & Manley, S.L. 2009. Release of reactive bromine and iodine from diatoms and its possible role in halogen transfer in polar and tropical oceans. *Limnology and Oceanography*. 54:812-822.

Hirata, S. & Toshimitsu, H. 2005. Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by HPLC-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 383:454-460.

Hirata, S., Toshimitsu, H. & Aihara, M. 2006. Determination of arsenic species in marine samples by HPLC-ICP-MS. *Analytical Sciences*. 22:39-43.

Holben, D.H. & Smith, A.M. 1999. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. *Journal of the American Dietetic Association*. 99:836-843.

Horton, S. 2006. The economics of food fortification. *Journal of Nutrition WM*. 136:1068-1071.

Hou, X. 2009. Iodine Speciation in Foodstuffs, Tissues, and Environmental Samples. En: *Comprehensive Handbook of Iodine*. Preedy (Ed). Burlington, USA: Elsevier. 139-150.

Hou, X., Yan, X. & Chai, C. 2000. Chemical species of iodine in some seaweed II: iodine-bound biological macromolecules. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 245:461-467.

Hsiao, S.C.I. 1969. Life-history and iodine nutrition of the marine brown alga, *Petalonia fascia*. *Canadian Journal of Botany*. 47, 1611-1616.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. & Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*. 54:621-639.

Hulbert, A.J. 2000. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biological Reviews*. 75:519-631.

Hung, C.C., Wong, G.T., Dunstan, W.M. 2005. Iodate reduction activity in nitrate reductase extracts from marine phytoplankton. *Bulletion of Marine Science*. 76:61-72.

Ikemoto, T., Kunito, T., Anan, Y., Tanaka, H., Baba, N. & Miyazaki, N. 2004. Association of heavy metals with metallothionein and other proteins in hepatic cytosol of marine mammals and seabirds. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23:2008-2016.

Imani, S., Rezaei-Zarchi, S., Hashemi, M., Borna, H., Javid, A., Zand, A.M., & Abarghouei H.B. 2011. Hg, Cd and Pb heavy metal bioremediation by *Dunaliella* alga. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5:2775-2780.

Ip, C. 1998. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *Journal of Nutrition*. 128:1845-1854.

Ip, C., & Dong, Y. 2001. Methylselenocysteine modulates proliferation and apoptosis biomarkers in premalignant lesions of the rat mammary gland. *Anticancer Research*. 21: 863-867.

Ip, C., & Lisk, D.J. 1994. Methylselenocysteine modulates proliferation and apoptosis biomarkers in premalignant lesions of the rat mammary gland. *Carcinogenesis*. 15: 573-576.

Iwamoto, K. & Shiraiwa, Y. 2012. Characterization of intracellular iodine accumulation by iodine-tolerant microalgae. *Procedia Environmental Science*, 2012; 15: 34-42.

J Jaime-Ceballos, B., Villerreal-Colmenares, H., García-Galano,

T., Civera-Cerecero, R. & Gaxiola-Cortes G. 2004. Empleo del polvo de *Spirulina platensis* en la alimentación de Zoeas y Mysis de *Litopenaeus schmitti*. In: Cruzo Suarez LE, Ricque Marie D, Nieto López MG, Villareal D, Scholz U y González M. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora, México.

Jiang, W., Zhu, Z., Ganther, H.E., Ip, C., & Thompson, H.J. 2001. Molecular mechanisms associated with Se-allylselenocysteine regulation of cell proliferation and apoptosis. *Cancer Letters*. 162:167-173.

Johansson, L., Gafvelin, G., & Arnér, E.S.J. 2005. Selenocysteine in proteins: properties and biotechnological use. *Biochimica et Biophysica ACTA*.1726: 1-13.

Johri, N., Jacquillet, G., & Unwin, R. 2010. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *BioMetals*. 162:167-173.

Jong-Yuh, C., & Mei-Fen, S. 2005. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sciences*. 77:980-990.

Joseph, J., & Loscalzo, J. 2013. Selenistasis: epistatic effects of selenium on cardiovascular phenotype. *Nutrients*. 5: 340-358.

Juneau, P., Dewez, D., Matsui, S., Kim, S.G., & Popovic, R. 2001. Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metalochlor by PAM-fluorometry. *Chemosphere*. 45:589-598.

Juresa, D., Blanusa, M., & Kostial, K. 2005. Simultaneous administration of sodium selenite and mercuric chloride decreases efficacy of DMSA and DMPS in mercury elimination in rats. *Toxicology Letters*. 155:97-102.

K Kaderbhai, N.N., Broadhurst, D.I., Ellis, D.I., Goodacre, R., &

Kell, D.B. 2003. Functional Genomics Via Metabolic Footprinting: Monitoring Metabolite Secretion by *Escherichia Coli* Tryptophan Metabolism Mutants Using FT-IR and Direct Injection Electrospray Mass Spectrometry. *Comparative and Functional Genomics*. 4:376-391.

Kark, R.A.P. 1994. Clinical and neurochemical aspects of inorganic mercury intoxication. In: de Wolff, F.A. (Ed.). *Handbook of Clinical Neurology*. 20: 367-411.

Kind, T., Scholz, M., Fiehn, O. 2009. How large is the metabolome? A critical analysis of data Exchange practises in chemistry. *Plos One*. 4:e5440.

Kingsley, R.J., Corcoran, M.L., Krider, K.L., Kriechbaum, K.L. 2001. Thyroxine and vitamin D in the gorgonian *Leptogorgia virgulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology*. 129:897-907.

Klaassen, C.D. 1989. Toxicology, the basic science of poisons. *Cassarete and Doull's Toxicology*. 1989; 254: 238-239.

Klejduš, B., Lojková, L., Plaza, M., Šnóbllová, M., & Šterbová, D. 2010. Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1217:7956–7965.

Klerks, P.L., & Bartholomew, P.R. 1991. Cadmium accumulation and detoxification in a Cd-resistant population of the oligochete *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Aquatic Toxicology*. 19:97-112.

Klimmek, S., Stan, H.J., Wilke, A., Bunke, G., & Buchholz, R. 2001. Comparative analyses of the biosorption of cadmium, lead, nickel and zinc by algae. *Environmental Science and Technology*. 35:4283-4288.

Kneer, R., Kutchan, T.M., Hochberger, A., & Zenk, M.H. 1992. *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Archives of Microbiology*. 4:305-310.

Koch, I., McPherson, K., Smith, P., Easton, L., Doe, K.G., & Reimer K.J. 2007. Arsenic bioaccessibility and speciation in clams and seaweed from a contaminated marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 54:586-594.

Kohlmeyer, U., Jantzen, E., Kuballa, J., & Jakubik, S. 2003. Benefits of high resolution IC-ICP-MS for the routine analysis of inorganic and organic arsenic species in food products of marine and terrestrial origin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 377:6-13.

Köhrle, J., Brigelius-Flohe, R., Bock, A., Gartner, R., Meyer, O., & Flohe, L. 2000. Selenium in biology: facts and medical perspectives. *Biological Chemistry*. 381: 849-864.

Kondo, N., Imai, K., Isobe, M., & Goto, T. 1984. Cadystin A and B, major unit peptide comprising cadmium binding peptides induced in a

fission yeast-separation, revision of structure and synthesis. *Tetrahedron Letters*. 25:3869-3872.

Konishi, F., Tanaka K., Himeno, K., Taniguchi, K., & Nomoto, K. 1985. Antitumor effect induced by a hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CE): resistance to Meth-A tumor growth mediated by CE-induced polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Immunology and Immunotherapy*. 19:73-78.

Koppenaal, D.W., & Hieftje, G.M. 2007. Metallomics-An Interdisciplinary and Evolving Field. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 22:855-855.

Kosta, L., Byrne, A.R., & Zelenko, V. 1975. Correlation between selenium and mercury in man following exposure to inorganic mercury. *Nature*. 254:238-239.

Koutras, D.A., Matovinovic, J., & Vought, R. 1980. The ecology of iodine. En: Stanbury JB, Heztel BS, editors. Endemic goiter and endemic cretinism: Iodine nutrition in health and disease. New York: Wiley. 185-195.

Kryukov, G.V., Castellano, S., Novolyselov, SV., Lobano, AV., Zehtab, O., Guigo, R., & Gladyshev, V.N. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. 300:1439-1443.

Kundel, M., Thorenz, U.R., Petersen, J.H., & Huang, R.J. Bings, NH, Hoffmann T. 2012. Application of mass spectrometric techniques for the trace analysis of short-lived iodine-containing volatiles emitted by seaweed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 84: 1439-1445.

Küpper, F.C., Carpenter, L.J., McFiggans, G.B., Palmer, C.J., Waite, T.J., Boneberg, E.M., Woitsch, S., Weiller, M., Abela, R., Grolimund, D., Potin, P., Butler, A., & Luther, G.W. 2008. Iodine accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:6954-6958.

Küpper, H., Küpper, F., & Spiller, M. 1998. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*. 47:259-266.

Küpper, H., Küpper, F., & Spiller, M. 1998. In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynthesis Research*. 58:123-133.

Kyriakopoulos, A., Bertelsman, H., Graebert, A., Hoppe, B., Kühbacher, M., & Behne, D. 2002. Distribution of an 18 kDa-selenoprotein in several tissues of the rat. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 16:57-62.

- L**a Barre, S., Potin, P., Leblanc, C. & Delage, L. 2010. The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. *Marine Drugs*. 31:988–1010.
- Leblanc, C., Colin, C., Cosse, A., Delage, L., La Barre, S., Morin, P., Fievet, B., Voiseux, C., Ambroise, Y., Verhaeghe, E., Amouroux, D., Donard, O., Tessier, E. & Potin P. 2006.** Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of the brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. *Biochimie*. 88:1773-1785.
- Ledesma, M.C., Jung-Hynes, B., Schmit, T.L., Kumar, R., Mukhtar, H. & Ahmad N. 2011.** Selenium and vitamin E for prostate cancer: prost-SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) status. *Molecular Medicine*. 17:134-143.
- Leemakers, M., Baeyens, W., De Gieter, M., Smedts, B., Meert, C., De Bisschop, C., Morabito, R. & Quevauviller, P. 2006.** Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. *Trends in Analytical Chemistry*. 25:1-10.
- Leung, A.M., Braverman, L.E., Pearce, E.N. 2012.** History of U.S. iodine fortification and supplementation. *Nutrients*. 4:1740-1746.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q. & Dubois-Calero, N. 2008.** Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*. 24:815–820.
- Li, Z.Y., Guo, S.Y., Li, L. 2003.** Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. *Bioresource Technology*. 89:171–176.
- Li, Z.Y., Guo, S.Y., Li, L. 2006.** Study on the process, thermodynamical isotherm and mechanism of Cr(III) uptake by *Spirulina platensis*, *Journal of Food Engineering*. 75: 129-136.
- Lichtenthaler, H.K. 1987.** Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148:350-382.
- Lefevre M. 1964.** Extracellular products of algae. En: *Algae and Man*. Jackson D.F. (Ed). Plenum Press, New York. 337-367.
- Leonzio, C., Focardi, S., Bacci, E. 1982.** Complementary accumulation of selenium and mercury in fish muscle. *Science of the Total Environment*. 24:249–254.

Larsen, P.R. & Berry, M.J. 1995. Nutritional and hormones regulation of thyroid hormone deiodinases. *Annual Review of Nutrition*. 15;323-352.

Langford, N.J. & Ferner, R.E. 1999. Toxicity of mercury. *Journal of Human Hypertension*. 13:651-656.

Levander O. 2001. Evolution of human dietary standards for selenium. En: Selenium: Its molecular biology and role in human health. D.L. Haltfield (Ed). Kluwer Academic Publishers.

Li P., Feng X., Qiu G., Shang, L., & Wang, S. 2012. Mercury pollution in Wuchuan mercury mining area, Guizhou, Southwestern China: The impacts from large scale and artisanal mercury mining. *Environment International*. 42: 59-66.

Li, S. & Li, W. 2011. Physiological and biochemical responses of antarctic microalga *Chlorella sp.* NJ-18 to salinity stress. *Fresenius Environmental Bulletin*. 20:1346-1351.

Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., Erroi, E., Schettino, T. 2012. Carbonic anhydrase as pollution biomarker: an ancient enzyme with a new use. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 9:3965-3977.

Lippard, S.J. & Berg, J.M. Principles of Bioinorganic Chemistry. Mill Valley, California., 1994.

Litov, R.E. & Combs, G.F. 1991. Selenium in pediatric nutrition. *Pediatrics*. 87:339-351.

Lobinski, R., Becker, J.S., Haraguchi, H., Sarkar, B. 2010. Metallomics: Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry. *Pure and Applied Chemistry*. 82:493-504.

Lobinski, R., Edmons, J.S., Suzuki, K.T., Uden, P.D. 2000. Species selective determination of selenium compounds in biological materials. *Pure and Applied Chemistry*. 72: 447-461.

Lobinski, R., Moulin, C., Ortega, R. 2006. Imaging and speciation of trace elements of trace elements in biological elements environment. *Biochemie*. 88:1591-1604.

Lodemann, U., Einspanier, R., Scharfen, F., Martens, H. & Bondzio, A. 2013. Effects of zinc on epithelial barrier properties and viability in a human and a porcine intestinal cell culture model. *Toxicology in Vitro*. 27:834-843.

Lomas, M.W. & Glibert, P.M. 1999. Temperature regulation of nitrate uptake: A novel hipótesis about nitrate uptake and reduction in cool-water diatoms. *Limnology and Oceanography*. 44: 556-572.

M

Madsen, A.D., Goessler, W., Pedersen, S.N., Francesconi,

K.A. 2000. Characterization of an algal extract by HPLC-ICP-MS and LC-electrospray MS for use in arsenosugar speciation studies. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 15:657-662.

Mahan, C.A., Majidi, V. & Holcombe, J.A. 1989. Evaluation of the metal uptake of several algae strains in a multicomponent matrix utilizing inductively coupled plasma emission spectrometry. *Analytical Chemistry*. 61:624-627.

Makarov, A. & Szpunar, J. 1998. The coupling of size-exclusion HPLC with ICP-MS in bioinorganic analysis. *Analisis*. 14:44-48

Manley S.L. 2002. Phyto-genesis of halomethanes: a product of selection or a metabolic accident?. *Biogeochemistry*. 60:163-180.

Manley, S.L., De La Cuesta, J.L. 1997. Methyl iodide (CH₃I) production from marine phytoplankton cultures. *Limnology and Oceanography*. 42:142-147.

Maret, W. & Copsey, M. (2012). Metallomics: whence and whither. *Metallomics*. 4: 1017-1019.

Marine, D. & Kimball, O.P. 1917. The prevention of the simple goiter in man. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 3:40-48.

Martinelango, P.K., Tian, K. & Dasgupta, P.K. 2006. Perchlorate in seawater-bioconcentration of iodine and perchlorate by various seaweed species. *Analytica Chimica Acta*. 567:100-107.

Mason, A.Z. & Jenkins, K.D. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. En *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, A., T. y R., T.D. (Eds). California: John Wiley & Sons Ltd. 479-608.

Mason, R.P., Reinfelder, J.R. & Morel, F.M.M. 1996. Uptake, toxicity and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. *Environmental Science & Technology*. 30:1835-1845.

Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14:217-232.

McConnell, O. & Fenical, W. 1977. Halogen chemistry of the red algae *Asparagopsis*. *Phytochemistry*. 16:367-374.

McDougall, G., Martinussen, I. & Stewart, D. 2008. Towards fruitful metabolomics: high throughput analyses of polyphenol composition in berries using direct infusion mass spectrometry. *Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 871:362-369.

McKenzie, R.C. & Rafferty, T.S. 2001. Effects of selenium on immunity and aging. In: Selenium its molecular biology and role in human health. Hatfield DL (Ed). Kluwer Academic Publishers.

McKenzie, R.C., Arthur, J.R. & Beckett G.J. 2002a. Selenium and the regulation of cell signalling, growth, and survival: molecular and mechanistic aspects. *Antioxidants and Redox Signalling*. 4:339-351.

McSheehy, S. & Szpunar, J. 2000. Speciation of arsenic in edible algae by bi-dimensional size-exclusion anion exchange HPLC with dual ICP-MS and electrospray MS/MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 15:79-87.

McSheehy, S., Pannier, F., & Szpunar, J. 2002b. Speciation of selenocompounds in yeast aqueous extracts by three dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray mass spectrometry detection. *Analyst*. 127:223-229.

McSheehy, S., Pohl, P., Szpunar, J., Potin-Gautier, M., & Lobinski R. 2001. Analysis for selenium speciation in selenized yeast extracts by two dimensional liquid chromatography with ICP-MS and Electrospray MS-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 16:68-73.

Mertz, W. 1987. Trace elements in human and animal nutrition, London: Academic Press. Inc.:1:355-356.

Michalke, B. & Schramel, P. (2004). Manganese speciation in human milk using inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 19: 121-128.

Mišurcová, L., Ambrožová, J. & Samek, D. 2011. Seaweed lipids as nutraceuticals. *Advances in Food and Nutrition Research*. 64:339-355.

Moisan, T.A., Dunstan, W.M., Udomkit, A. & Wong, G.T. 1994. The uptake of iodate by marine phytoplankton. *Journal of Phycology*. 30:580-587.

Moore, R.M., Webb, M., Tokarczyk, R., Wever, R. 1996. Bromoperoxidase and iodoperoxidase enzymes and production of halogenated methanes in marine diatom cultures. *Journal of Geophysical Research*. 101:20899-20908.

Morita, K., Ogata, M. & Hasegawa, T. 2001. Chlorophyll derived from *Chlorella* inhibits dioxin absorption from the gastrointestinal tract and accelerates dioxin excretion in rats. *Environmental Health Perspectives*. 109: 289-294.

Morlon H, Fortin C, Floriani M, Adam C, Garnier-Laplace J. & Boudou A. 2005a. Toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: comparison between effects at the population and sub-cellular level. *Aquatic Toxicology*. 73:65-78.

Morlon, H., Fortin, C., Adam, C. & Garnier-Laplace, J. 2005b. Cellular quotas and induced toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Radioprotection*. 40:101-106.

Morlon, H., Fortin, C., Adam, C. & Garnier-Laplace, J. 2006. Selenite transport and its inhibition in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Toxicology & Chemistry*. 25:1408-1417.

Morreale de Escobar, G. & Escobar del Rey, F. 2000. El yodo durante la gestación, lactancia y primera infancia. Cantidades mínimas y máximas de microgramos a gramos. *Anales de Pediatría*. 53:1-5.

Mostert, V. 2000. Selenoprotein P: properties, functions, and regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 376:433-438.

Mounicou, S., Szpunar, J. & Lobinski, R. 2009. Metallomics: The concept and methodology. *Chemical Society Reviews*. 38:1119-11138.

Müller, C., Wingler, K. & Brigelius-Flohé. 2003. 3'UTRs of Glutathione Peroxidases Differentially Affect Selenium-Dependent mRNA Stability and Selenocysteine Incorporation Efficiency. *Biological Chemistry*. 384:11-18.

Nagao, T., Suketa, Y. & Okada, S. 1983. Comparative absorption and excretion of *Chlorella ellipsoidea* cadmium binding protein and inorganic cadmium in rats. *Japanese Journal of Hygiene*. 10:741-747.

Narukawa, T., Inagaki, K., Zhu, Y., Kuroiwa, T., Narushima, I., Chiba, K. & Hioki, A. 2012. Preparation and certification of Hijiki reference material, NMI J CRM 7405-a, from the edible marine algae hijiki (*Hizikia fusiforme*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 402:1713-1722.

Navarro-Alarcón, M. & Cabrera-Vique, C. 2008. Selenium in food and the human body: A review. *Science of the total environment*. 400:115-141.

Navarro-Alarcón, M., López-Martín, M.C. 2000. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Science of the Total Environment*. 249:347-371.

Neumann, P.M., DeSouza, M.P., Pickering, I.J. & Terry, N. 2003. Rapid microalgal metabolism of selenate to volatile dimethylselenide. *Plant Cell & Environment*. 26:897-905.

Nicholson, J.K., Lindon, J.C. & Holmes, E. 1999. "Metabonomics": Understanding the metabolic response of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopy data. *Xenobiotica*. 29:1181-1189.

Nielsen, C.O. & Dietz, R. 1990. Distributional pattern of zinc, cadmium, mercury, and selenium in livers of hooded seal (*Cystophora cristata*). *Biological Trace Element Research*. 24:61-71.

Nurmi, J.T., Tratnyek, P.G., Sarathy, V., Baer, D.R., Amonette, J.E., Pecher, K., Wang, C.M., Linehan J.C., Matson, D.W. & Penn, R.L. 2005. Characterization and properties of metallic iron nanoparticles: spectroscopy, electrochemistry, and kinetics. *Environmental Science & Technology*. 39:1221-1230.

Ogra, Y. & Anan, Y. 2012. Selenometabolomics explored by speciation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 35:1863-1869.

Olaizola, M. & Yamamoto, H.Y. 1994. Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 30:606-612.

Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to de marketplace. *Biomolecular Engineering*. 20:459-466.

Otha, Y., Kobayashi, Y., Kosishi, S. & Hirano, S. 2009. Speciation analysis of selenium metabolites in urine and breath by HPLC- and GC-Inductively Coupled Plasma-MS after administration of selenomethionine and methylselenocysteine to rats. *Chemical Research in Toxicology*. 22:1795-1801.

Ouerdane, L., Mari, S., Czernic, P., Lebrun, M. & Lobinski, R. 2006. Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after their isolation by 2D size exclusion-hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 21:676-683.

P

aisio, C.E., González, P.S., Talano, M.A. & Agostini, E. 2012.

Remediación biológica de Mercurio: Recientes avances. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. 3:119-146.

Palou, A. & Serra, P. 2000. Perspectives europeas sobre alimentos funcionales. *Alimentación, Nutrición y Salud*. 7:76-90.

Papp, L.V., Lu, J., Holmgren, A. & Khanna, K.K. 2007. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants & Redox Signaling*. 9:775-806.

Parizek, J. & Ostadalova, I. 1967. The protective effect of small amounts of selenite in sublimate intoxication. *Experientia*. 23:142-143.

Patching, S.G. & Gardiner, P.H. 1999. Recent developments in selenium metabolism and chemical speciation: a review. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 13:193-214.

Patti, G.J., Yanes, O. & Siuzdak, G. 2012. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 22:263-269.

- Pawlik-Skowronska, B. 2001.** Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. *Aquatic Toxicology*. 52:241-249.
- Payo, D.A., Colo, J., Calumpong, H. & de Clerck, O. 2011.** Variability of non-polar secondary metabolites in the red alga *Portieria*. *Marine Drugs*. 9:2438-2468.
- Pedersen, L. 1969.** Marine brown algae requiring vitamin B₁₂. *Physiologia Plantarum*. 22:680-685.
- Pedrero, Z. & Madrid, Y. 2009.** Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Analytica Chimica Acta*. 634:135-152.
- Pérez-López, F.R. 2007.** Iodine and thyroid hormones during pregnancy and postpartum. *Gynecological Endocrinology*. 23:414-428.
- Pérez-Roncero, G., Martínez-Deearth, R., López-Baena, M.T., Pérez-López, F. 2013.** The importance of iodine nutrition during pregnancy. *Revista Ciencias Biomédicas*. 4:108-115.
- Polatajko, A., Sliwka-Kaszynska, M., Dernovics, M., Ruzik, R., Encinar, J.R. & Spuznar, A.J. 2004.** Systematic approach to selenium speciation in selenized yeast. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 19:114-120.
- Polec, K., García-Arribas, O., Pérez-Calvo, M., Szpunar, J., Ribas-Ozonas, B., & Lobinski, R. 2000.** Identification of cadmium-bioinduced ligands in rat liver using parallel HPLC-ICP-MS and HPLC-electrospray MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 15:1363-1368.
- Portertield, J.P., Hendrich, C.E. 1993.** The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development-current perspectives. *Endocrine Reviews*. 14:94-106.
- Pulz, O. & Gross, W. 2004.** Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65:635-648.
- Pyrzynska, K. 2001.** Analysis of selenium species by capillary electrophoresis. *Talanta*. 55:657-667.

Raber, G., Francesconi, K.A., Irgolic, K.J. & Goessler, W.

2000. Determination of arsenosugars in algae with anion-exchange chromatography and an inductively coupled plasma mass spectrometer as element-specific detector. uatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 367:181-188.

Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N.A., Sridhar, S. & Rengasamy, R. 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*. 34:77-88.

Rangsayator, N., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Lanza, G.R. 2002. Phytoremediation potential of *Spirulina (Arthrospira) platensis*: biosorption and toxicity studies of cadmium. *Environmental Pollution*. 119:45-50.

Ratha, S.K. & Prasanna, R. 2012. Bioprospecting microalgae as potential sources of "green energy"-challenges and perspectives. *Prkl Biokhim Mikrobiol*. 48:133-149.

Rausser, W.E. 1995. Phytochelatin and related peptides: structure, biosynthesis and function. *Plant Physiology*. 109:1141-1149.

Rayman, M.P. 2000. The importance of selenium to human health. *The Lancet*. 356:233-241.

Rayman, M.P. 2002. The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society*. 61:203-215.

Rayman, M.P. 2004. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up?. *British Journal of Nutrition*. 92:557-573.

Rayman, M.P. 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society*. 64:527-542.

Rayman, M.P. 2012. Selenium and human health. *The Lancet*. 379:1256-1268.

Rayman, M.P., Goenaga-Infante, H. & Sargent, M. 2008. Food chain selenium and human health: spotlight on speciation. *British Journal of Nutrition*. 100:238-253.

Rea, P.A. 2006. Phytochelatin synthase, papain's cousin, in stereo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:507-508.

Rea, P.A., Li, Z., Lu, Y., Drozdowicz, Y.M. & Martinoia, E. 1998. From vacuolar GS-X pumps to multiespecific ABC transporters. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49:727-760.

Rea, P.A., Vatamaniuk, O.K. & Rigden, D.J. 2004. Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. *Plant Physiology*. 136:2463-2474.

Reed, P., Terry, F.D., Schlumberger, M.J., Hay, I.D. 2003. Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. *Williams Textbook of Endocrinology*. 10th Ed. Pensilvania: Saunders. 331-65.

Reid, M.E., Stratton, M.S., Lillico, A.J., Fakh, M., Natarajan, R., Clark, L.C. & Marshal, J.R. 2004. A report of high-dose of selenium supplementation: response and toxicities. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 18:69-74.

Reunova, Y.A., Aizdaicher, N.A., Khristoforova, N.K., Reunov, A.A. 2007. Effects of selenium on growth and ultrastructure of the marine unicellular alga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Russian Journal of Marine Biology*. 33:125-132.

Richmond, A. 1990. Large scale microalgal culture and applications. In: Round M and Chapman S, ed. "Progress in Phycological Research". *Biopress Ltd*. 269-330.

Richmond, A. 2004. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, first ed. Blackwell Science, Oxford.

Ristic-Medic, D., Piskackova, Z., Hooper, L., Ruprich, J., Casgrain, A., Ashton, K., Pavlovic, M. & Glibetic, M. 2009. Methods of assessment of iodine status in humans: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 89:2052S-2069S.

Ritter, A., Goultquer, S., Salaün, J.P., Tonon, T., Correa J.A. & Potin, P. 2008. Copper stress induces biosynthesis of octadecanoid and eicosanoid oxygenated derivatives in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *New Phytol*. 2008; 180: 809-821.

Roberfroid, M.B. 2002. Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*. 088:133-138.

Röderer, G. 1983. Differential toxic effects of mercuric chloride and methylmercuric chloride on the freshwater alga *Poteroochromonas malhamensis*. *Aquatic Toxicology*. 3: 23-24.

Roger, P.P., Christophe, D., Dumont, J.E. & Pirson, I. 1997. Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂ generating system. *European Journal of Endocrinology*. 137:579-598.

Rosenber, E. 2003. The potential of organic (electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid phase separation for speciation analysis. *Journal of Chromatography A*. 1000:841-889.

Roti, E. & Uberti, E.D. 2001. Iodine excess and hyperthyroidism. *Thyroid*. 11:493-500.

Rotruck, J.T., Pope, A.L., Gauther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. & Hoekstra, W.G. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 179:588-590.

Ruby, M.V., Schoof, R., Brattin, W., Goldade, M., Post, G., Harnois, M., Mosby, D.E., Berti, S.W., Carpenter, M., Edwards, D., Cragin, D. & Chappell, W. 1999. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science & Technology*. 33:3697-3705.

S

Salunke, R., Rawat, N., Tiwari, V.K., Neelam, K., Randhawa,

G.S., Dhaliwal, H.S. & Roy, P. 2012. Determination of bioavailable-zinc from biofortified wheat using a coupled in vitro digestion/Caco-2 reporter-gene based assay. *Journal of Food Composition and Analysis*. 25:149-159.

Sanita di Toppi, L. & Gabrielli, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*. 41:105-130.

Sansawa, H., Takahashi, M., Tsuchikura, S. & Endo, H. 2006. Effect of *Chlorella* and its fractions on blood pressure, cerebral stroke lesions, and life span in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 52:457-466.

Sanz Medel, A., Montes Bayon, M. & Luisa Fernández, S.M. 2003. Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 377: 236-247.

- Sanz-Medel, A. 2005.** From metalloproteomics to heteroatom-tagged proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 381:1-2.
- Sanz-Medel, A. 2008.** Heteroatom (isotope)-tagged genomics and proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 390:1-2.
- Sasakura, C., Suzuki, K.T. 1998.** Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 71:159-162.
- Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J. & Bleeker, P.M. 2002.** The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and nonhyperaccumulator metallophytes. *Journal of Experimental Botany*. 53:2381-2392.
- Schaumlöffel, D., Ruiz Encinar, J., Lobinski, R. 2003.** Development of a Sheathless Interface between Reversed-Phase Capillary HPLC and ICPMS via a Microflow Total Consumption Nebulizer for Selenopeptide Mapping. *Analytical Chemistry*. 75:6837-6842.
- Schiavon, M., Moro, I., Pilon-Smits, E.A.H., Matozzo, V., Malagoli, M. & DellaVecchia, F. 2012.** Accumulation of selenium in *Ulva sp.* and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. *Aquatic Toxicology*. 122:222-231.
- Schmeisser, E., Goessler, W., Kienzl, N., Francesconi, K.A. 2004.** Volatile analytes formed from arsenosugars: Determination by HPLC-HG-ICPMS and implications for arsenic speciation analyses. *Analytical Chemistry*. 76:418-423.
- Schmitt, D., Muller, A., Csogor, Z., Frimmel, F.H. & Posten, C. 2001.** The adsorption kinetics of metal ions onto different microalgae and siliceous earth. *Water Research*. 35:779-785.
- Schümann, K., Classen, H.G., Hages, M., Prinz-Langenohl, R., Pietrzik, K. & Biesalski, H.K. 1997.** Bioavailability of oral vitamins, minerals, and trace elements in perspective. *Drug Research*. 47:369-380.
- Schwarz, K. & Foltz, C.M. 1957.** Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*. 79:3292-3293.
- Scott, R. & MacPherson, A. 1998.** Selenium supplementation in sub-fertile human males. *British Journal of Urology*. 82:76-80.

Scout, R. & MacPherson, A. 1998. The effect of oral Selenium supplementation on human sperm motility. *British Journal of Urology*. 82:76-80.

Seiler, H.G., Sigel, H. & Sigel, A. 1988. Handbook on toxicity of inorganic compounds. New York: Marcel Dekker, Inc.

Semba, R.D. & Dagnelie, G. 2003. Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health. *Medical Hypotheses*. 61:465-472.

Ševčíková, S., Skřivan, M., Dlouhá, G. & Koucký, M. 2006. The effect of selenium source on the performance and meat quality of broiler chickens. *Czech Journal of Animal Science*. 51:449-457.

Shah, M., Wuilloud, R.G., Kannamkumaratha, S.S. & Caruso, J.A. 2005. Iodine speciation studies in commercially available seaweed by coupling different chromatographic techniques with UV and ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 20:176-182.

Sharma, V.K. & Sohn, M. 2009. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environment International*. 35:743-759.

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P. & Weissman, J. 1998. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: biodiesel from algae; Close-Out Report. NREL Report No.TP-580- 24190.

Shen, L., Van Dyck, K., Lutem, J. & Beckett, G.J. 1997. Diffusibility of selenate, selenite, seleno-methionine, and seleno-cystine during simulated gastrointestinal digestion. *Biological Trace Element Research*. 58:55-63.

Shiobara, Y., Ogra, Y. & Suzuki, K.T. 1999. Speciation of metabolites of selenate in rats by HPLC-ICP-MS. *Analyst*. 124:1237-1241.

Shiobara, Y., Yoshida, T. & Suzuki, K.T. 1998. Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood and urine. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 152:309-314.

Shrauzer, G.N. 2000. Selenomethionine. A review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *Journal of Nutrition*. 130:1653-1656.

Shroeder, H.A. & Nason A.P. 1971. Trace element analysis in clinical chemistry. *Clinical Chemistry*. 17:461-474.

Silveira-Rodriguez, M.B., Monereo-Megías & S., Molina-Baena, B. 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos? *Revista Española de la Salud Pública.* 77:317-331.

Simon, S., Tran, H., Pannier, F., Potin-Gautier, M. 2004. Simultaneous determination of twelve inorganic and organic arsenic compounds by liquid chromatography-ultraviolet irradiation-hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 1024:105-113.

Singh, A., Nigam, P.S. & Murphy, J.D. 2011. Mechanism and challenges in commercialization of algal biofuels. *Bioresource Technology.* 102:26-34.

Skaare, J.U., Degre, E., Aspholm, P.E. & Ugland, K.I. 1994. Mercury and selenium in arctic and coastal seals off the coast of Norway. *Environmental Pollution.* 85:153-160.

Skrivan, M., Marounek, M., Dlouhá, G. & Ševčíková, S. 2008. Dietary selenium increases vitamin E contents of egg yolk and chicken meat. *British Poultry Science.* 482-486.

Skrivan, M., Simane, J., Dlouhá, G. & Doucha, J. 2006. Effect of dietary sodium selenite, Se-enriched yeast and Se-enriched *Chlorella* on egg Se concentration, physical parameters on eggs and laying hens production. *Czech Journal of Animal Science.* 51:163-167.

Sloth, J.J., Larsen, E.H. & Julshamn, K. 2005. Survey of inorganic arsenic in marine animals and marine certified reference materials by anion exchange high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53:6011-6018.

Smyth, P.P. 2003. Role of iodine in antioxidant defence in thyroid and breast disease. *Biofactors.* 19:121-130.

Sørmo, E., Ciesielki, T.M., Overjordet, I.B., Lierhagen, S., Eggen, G.S., Berg, T., Jenssen, B.M. 2001. Selenium moderates mercury toxicity in free-ranging freshwater fish. *Environmental Science & Technology.* 45:6561-6566.

Sors, T.G., Ellis, D.R. & Salt, D.E. 2005. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research.* 86:373-389.

South, G.R. & Whittick, A. 1987. Introduction to Phycology. Blakwell Scientific Publication, UK.

Spallhoz, J.E. 2001. The Bulletin of selenium-tellurium Development Association. May, 1.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101:87-96.

Stadtman TC. 1980. Selenium-dependent enzymes. *Annual Review Biochemistry*. 49:93.

Storelli, M.M. & Marcotrigiano, G.O. 2002. Mercury speciation and relationship between mercury and selenium in liver of *Galeus melastomus* from the Mediterranean sea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 69:516-522.

Storelli, M.M., Ceci, E. & Marcotrigiano, G.O. 1998. Comparison of total mercury methylmercury, and selenium in muscle tissues and in the liver of *Stenella coeruleoalba* (Meyen) and *Caretta caretta* (Linnaeus). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 61:541-547.

Sunda, W.G. & Gessner, R.V. 1989. The production of extracellular copper complexing ligands by marine and estuarine fungi. *Chemical Speciation & Bioavailability*. 1:65-70.

Suzuki, K.T. & Ogra, Y. 2001. Metabolism of selenium and its interaction with mercury: mechanisms by a speciation study. *Phosphorus, Sulphur, and Silicon and the Related Elements*. 171:135-169.

Suzuki, K.T. 2005. Metabolomics of Selenium: Se metabolites based on speciation studies. *Journal of Health Science*. 51:107-114.

Suzuki, K.T., Ishiwata, K. & Ogra, Y. 1999. Incorporation of selenium into selenoproteins P and extracellular glutathione peroxidase: HPLC-ICPMS data with enriched selenite. *Analyst*. 124:1749-1753.

Svoboda, M., Saláková, A., Fajt, Z., Kotrbáček, V., Ficek, R. & Drábek, J. 2009. Efficacy of Se-enriched alga *Chlorella spp.* and Se-enriched yeast on tissue selenium retention and carcass characteristics in finisher pigs. *Acta Veterinaria Brno*. 78:579-587.

Swann, J.R, Want, E.J., Geier, F.M., Spagou, K., Wilson, I.D., Sidaway, J.E., Nicholson, K. & Holmes, E. 2004. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378: 54-56.

Swann, J.R., Want, E.J., Geier, F.M., Spagou, K., Wilson, I.D., Siaway J.E., & Nicholson, J.K. 2011. Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:4523-4530.

Szpunar, J. 2000. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst*. 125:963-988.

Szpunar, J. 2004. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378:54-56.

Szpunar, J. 2005. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst*. 130:442-465.

Szpunar, J., Lobinski, R., Prange, A. 2003. Hyphenated Techniques for Elemental Speciation in Biological Systems. *Applied Spectroscopy*. 57:102A-111A.

T

abatabaei, M., Tohidfar, M., Jouzani, G.S., Safarnejad, M. &

Pzouki, M. 2011. Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Gurute of bioenergy in Iran. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 15:1918-1927.

Tainer, J.A., Roberts, V.A. & Getzoff, E.D. 1991. Metal-binding sites in proteins. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2:582-591.

Tanaka, K., Konishi, F., Himeno, K., Taniguchi, K. & Nomoto, K. 1984. Augmentation of antitumor resistance by a strain of unicellular green algae *Chlorella vulgaris*. *Cancer Immunol Immunother*. 17:90-94.

Tapiero, H., Townsend, D.M. & Tew, K.D. 2003. The antioxidant role of selenium and selenocompounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 57:134-144.

Taurog, A. 1999. Molecular evolution of thyroid peroxidase. *Biochimie*. 323:529-535.

Taylor, H.E. 2001. Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry. Practices and Techniques.

Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Lars-Göran, D., Muntau, H., Van Leewen, H.P. & Lobinski, R. 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements.

Definitions, structural aspects, and methodological approaches IUPAC Recommendations. *Pure. Appl. Chem.* 72:1453-1470.

Thiry, C., Ruttens, A., De Temmerman, L., Schneide, Y.J. & Pussemier, L. 2012. Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chemistry*. 130:767-784.

Thomas, J.P., Geiger, P.G., Maiorino, M., Ursini, F. & Girotti, A.W. 1990. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1045:252-260.

Thomas, R. 2004. Practical Guide to ICP-MS.

Thomson, C.D. 2004. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*. 58:391-402.

Thomson, D., Maher, W. & Foster, S. 2007. Arsenic and selected elements in inter-tidal and estuarine marine algae, south-east coast, NSW, Australia. *Appl. Organomet. Chem.* 21:396-411.

Thunus, L., Lejeune, R. 1994. Clinical and Analytical Chemistry, Marcel Dekker, New York, Basel. 333.

Tonacchera, M., Dimida, A., De Servi, M., Frigeri, M., Ferrarini, E., De Marco, G., Grasso, L., Agretti, P., Piaggi, P., Aghini-Lombardi, F., Perata, P., Pinchera, A. & Vitti, P. 2013. Iodine fortification of vegetables improves human iodine nutrition: in vivo evidence for a new model of iodine prophylaxis. *J Clin Endocrinol Metab.* 98:694-697.

Tonon, T., Eveillard, D., Prigent, S., Bourdon, J., Potin, P., Boyen, C. & Siegel, A. 2011. Toward systems biology in brown algae to explore acclimation and adaptation to the shore environment. *OMICS*. 15:883-892.

Torres, M.A., Barros, M.P., Campos, S.C., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R.T. & Colepicolo, P. 2008. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. *Ecotoxicol Environ Saf.* 71:1-15.

Tran, D., Moody, A.J., Fisfer, A.S., Foulkes, M.E. & Jha, A.N. 2007. Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. *Aquat Toxicol.* 84: 11-18.

Travnicek, J., Pisek, L., Herzig, I., Doucha, J., Kvicala, J., Kroupova, V. & Rodinova, H. 2007. Selenium content in the blood serum and urine of ewes receiving selenium enriched unicellular alga *Chlorella*. *Veterinarni Medicina*. 52:42-48.

Tredici, M.R. 2010. Photobiology of microalgae mass culture: understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels*. 1:143–162.

Truesdale, V.W. & Bailey, G.W. 2002. Iodine distribution in the Southern Benguela system during an upwelling episode. *Continental Shelf Research*. 22:39-49.

Tsunogai, S. & Sase, T. 1969. Formation of iodide-iodine in the ocean. *Deep-Sea Res.* 16:489-496.

Tukai, R., Maher, W.A., McNaught, I.J. & Ellwood, M.J. 2002. Measurement of arsenic species in marine macroalgae by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. 457:173-185.

U

Umysová, D., Vítová, M., Doušková, I., Bišová, K., Hlavová, M., Žižková, M., Machát, J., Doucha, J. & Zachleder, V. 2009. Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *BMC Plant Biology*. 9:58-74.

Ursini, F., Maiorino, M., Greogolin, C. 1985. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 839:62-79.

USDA (United States Department of Agriculture), Food and Nutrition Board. (2000). *Dietary Reference Intakes: Vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids*. National Academy Press, Estados Unidos.

V

van der Meer, J.R., Tropel, D., Jaspers, M. 2004. Illuminating the detection chain of bacterial bioreporters. *Environmental Microbiology*. 6:1005-1020.

Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P. & Rea, P.A. 2000. Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:31451-31459.

Verhaeghe, E.F., Fraysse, A., Guerquin-Kern, J.L., Wu, T.D., Devès, G., Mioskowski, C., Leblanc, C., Ortega, R., Ambroise, Y. & Potin, P. 2008. Microchemical imaging of iodine distribution in the brown alga

Laminaria digitata suggests a new mechanism for its accumulation. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 13:257–269.

Vítová, M., Bišová, K., Hlavová, M., Zachleder, V., Rucki, M. & Čížková, M. 2011. Glutathione peroxidase activity in the selenium-treated alga *Scenedesmus quadricauda*. *Aquatic Toxicology*. 102:87–94.

Waite, T.J. & Truesdale, V.W. 2003. Iodate reduction by

Isochrysis galbana is relatively insensitive to deactivation of nitrate reductase activity—are phytoplankton really responsible for iodate reduction in seawater? *Marine Chemistry*. 81:137–148.

Waiwood, B.A., Zitko, V., Haya, K., Burridge, L.E. & McLeese D.W. 1987. Uptake and excretion of zinc by several tissues of the lobster (*Homarus americanus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 6:27–32.

Walter, G., Grill, E., Ernst-Ludwing, W. & Meinhart, H. 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Archives of Microbiology*. 150:197–202.

Wang, B., Li, Y., Wu, N. & Lan, C.Q. 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79:707–718.

Wang, B., Li, Y., Wu, N. & Lan, C.Q. 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79:707–718.

Wang, W.X., Wong, R.S.K, Wang, J. & Yen, Y.F. 2004. Influences of different selenium species on the uptake and assimilation of Hg(II) and methylmercury by diatoms and green mussels. *Aquatic Toxicology*. 68:39–59.

Wartburton, E. & Goenage-Infante, H. 2007. Methane mixed plasma improved sensitive of inductively coupled plasma mass spectrometry detection for selenium speciation analysis of wheat-based food. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 22:370–376.

Wase, N., Black, P.N., Stanley, B.A., & DiRusso, C.C. 2014. Integrated quantitative analysis of nitrogen stress response in *Chlamydomonas reinhardtii* using metabolite and protein profiling. *Journal of Proteome Research*. 13:1373–1393.

Watanabe, C., Yin, K., Kasanuma, Y. & Satoh, H. 1999. In utero exposure to methylmercury and selenium deficiency converge on the neurobehavioral outcome in mice. *Neurotoxicology and Teratology*. 21:83–88.

Wei, C., Li, W., Zhang, C., Van Hulle, M., Cornelis, R., Zhang, X. 2003. Safety evaluation of organoarsenical species in edible Porphyra from the China sea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:5176-5182.

Whanger, P.D. 2002. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *The Journal of the American College of Nutrition*. 21:223-232.

Wheeler, A.E., Zingaro, R.A. & Irgolic, K. 1982. The effect of selenate, selenite and sulfate on growth of six unicellular marine algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 57:181-194.

WHO (World Health Organization). Methylmercury Vol. 101, IPCS International Program on Chemical Safety, 1990, World Health Organization, Ginebra.

WHO, UNICEF, ICCIDD. Assessment of iodine deficiency disorders their elimination: a guide for programme managers. 3rd ed. Geneva, Switzerland.

Wiersinga, W.M., Podoba, J., Srbecky, M., van Vessem, M., van Beeren, H.C. & Platvoet-Ter Schiphorst, M.C. 2001. A survey of iodine intake and thyroid volume in Dutch schoolchildren: reference values in an iodine-sufficient area and the effect of puberty. *European Journal of Endocrinology*. 144:595-603.

Wijffels, R.H. & Barbosa, M.I. 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science*. 329:796-799.

Wijffels, R.H., Kruse, O. & Hellingwerf, K.J. 2013. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*. 24:405-413.

Williams, R.J.P. 2001. Chemical selection of elements by cells. *Coordination Chemistry Reviews*. 216:583-595.

Wolfe-Simon, F., Switzer Blum, J., Kulp, T.R., Gordon, G.W., Hoeft, S.E., Pett-Ridge, J., Stolz, J.F., Webb, S.M., Weber, P.K., Davies, P.C.W., Anbar, A.D., Oremland & R.S. 2010 A Bateriaium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. *Science*. 332:1163-1116.

Wong, G.T., Piumsomboon, A.U. & Dunstan, W.M. 2002. The transformation of iodate to iodide in marine phytoplankton cultures. *Marine Ecology Progress Series*. 237:27-39.

Wrench, J.J. 1978. Selenium Metabolism in the Marine Phytoplankters *Tetraselmis tetrathele* and *Dunaliella minuta*. *Marine Biology*. 49:231-236.

Wrobel, K., Wrobel, K., Parker, B., Kannamkumarath, S.S., Caruso, J.A. 2002. Determination of As(III), As(V), monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and arsenobetaine by HPLC-ICP-MS: analysis of reference materials, fish tissues and urine. *Talanta*. 58:899-907.

Xu, B., Chia, S.E., Tsakok, M., Ong, C.N. 1993. Trace elements in blood and seminal plasma and their relationship to sperm quality. *Reproductive Toxicology*. 7:613-618.

Yamaguchi, K. 1997. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *Journal of Applied Phycology*. 8:487-502.

Yan, L. & DeMars, L.C. 2014. Effects of a high-fat diet on spontaneous metastasis of Lewis lung carcinoma in plasminogen activator inhibitor-1 deficient and wild-type mice. *PLoS ONE*, 9:10e110869.

Yang, D.Y., Chen, Y.W., Gunn, J.M. & Belzile, N. 2008. Selenium and mercury in organisms: Interactions and mechanisms. *Environmental Reviews*. 16:71-92.

Yasutake A & Hirayama K. 2001. Evaluation of methylmercury biotransformation using rat liver slices. *Archives of Toxicology*. 75: 400-406.

Ye, Z.W., Jiang, J.G. and Wu & G.H. 2008. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects. *Biotechnology Advance*. 26:352-360.

Yen, P.M. 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Reviews*. 81:1097-1142.

Yoneda, S. & Suzuki, K.T. 1997. Equimolar Hg-Se complex binds to selenoprotein P. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 231:7-11.

Yoshizawa, K., Willet, W.C., Morris, S.J., Stampfer, M.J., Spigelman, D. & Rimm, E.B. 1998. Study of prediagnostic selenium level in toenails and the risk of advanced prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 90:1219-1224.

Yu, S.Y., Zhu, Y.J. & Li, W.G. 1999. Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection. *American Journal of Epidemiology*. 150, 367-374.

Yuan, Y.V., Westcott, N.D., Hu, C. & Kitts, D.D. 2009. Mycosporine-like amino acid composition of the edible red alga, *Palmaria palmata* (dulse) harvested from the west and east coasts of Grand Manan Island, New Brunswick. *Food Chemistry*. 112:321-328.

Z

enk, M.H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants- a review. *Gene*. 179:21-30.

Zhang, J.H., Wang, L., Li, G.X., Anderson, L.B., Xu, Y.J., Witthuhn, B. & Lu, J.X. 2011. Mouse prostate are differentially altered by supranutritional intake of four selenium compounds. *Nutrition and Cancer*. 63:778-789.

Zhang, Y. & Gladyshev, V.N. 2009. Comparative Genomics of Trace Elements: Emerging Dynamic View of Trace Element Utilization and Function. *Chemical Reviews*. 109:4828-4861.

Zhang, Y., & Gladyshev, V.N. 2008. Trends in Selenium utilization in marine microbial world revealed through the analysis of the global ocean sampling (GOS) Project. *Plos Genet*. 4:10.1371/journal.pgen.1000095.

Zheng, W., Chen, C., Wang, Y., Bao, K., Wang, X., & Chu, C. 2005. Effects of potassium iodide on the growth and metabolite accumulation of two planktonic diatoms. *Journal of Applied Physics*. 17:355-362.

Zhou, J.L., Huang, P.L. & Lin, R.G. 1998. Sorption and desorption of Cu and Cd by macroalgae and microalgae. *Environmental Pollution*. 10:67-75.

Zimmermann, M.B & Crill C.M. 2010. Iodine in enteral and parenteral nutrition. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology Metabolism*. 24:143-158.

Zimmermann, M.B. & Delange, F. 2004. Iodine supplementation of pregnant women in Europe: a review and recommendations. *European Journal of Clinical Nutrition*. 58:979-984.

Zmora, O. & Richmond, A. 2004. Microalgae for aquaculture. En: Richmond (Ed.). *Handbook of Microalgae culture*. Blackwell Science Ed. USA.

Anexos

ANEXO I: Índice de Figuras

Figura 1. Concentración y respuesta de elementos.	16
Figura 2. Compuestos de selenio.	19
Figura 3. Metabolismo de selenio en humanos.	20
Figura 4. Ruta metabólica de selenio.	21
Figura 5. Principales selenoproteínas.	25
Figura 6. Formación de hormonas tiroideas.	36
Figura 7. Biomagnificación de las concentraciones de mercurio en el medio de acuático.	43
Figura 8. Formación del complejo Hg-Se-SeP.	46
Figura 9. Variedad de microalgas más comunes.	47
Figura 10. Diferentes usos de microalgas.	48
Figura 11. Estructura molecular de pigmentos clorofilicos y carotenoides principales en microalgas clorofitas.	50
Figura 12. Mecanismos de detoxificación de metales pesados presentes en microorganismos.	56
Figura 13. a. Estructura química del GSH, b. estructura química de fitoquelatina (n=2-6), c. vía de síntesis de fitoquelatinas canónicas de glutamina, Cys, Gly y a través de -Glu-Cys(-EC) y GSH	57
Figura 14. Representación esquemática del metabolismo celular del GSH en distintos organismos mediante exposición a Cd.	58
Figura 15. Representación esquemática del metabolismo del selenio en plantas superiores y microalgas.	70
Figura 16. Esquema simplificado de un sistema biológico y las -ómicas que nos aportan información acerca del mismo.	74
Figura 17. Representación esquemática de las biomoléculas que contienen un heteroelemento endógeno.	76
Figura 18. Representación esquemática del equipo ICP-MS Agilent 7500ce.	78
Figura 19. Representación esquemática de las técnicas híbridas utilizadas para la especiación de metales traza en los fluidos biológicos.	79

Figura 20. Representación del funcionamiento de una fuente de ionización ESI.	82
Figura 21. Esquema del funcionamiento del dispositivo MALDI-TOF-MS	84
Figura 22. Representación esquemática de las técnicas analíticas utilizadas en un estudio metabolómico.	91
Figura 23. Cultivo de microalgas.	106
Figura 24. Cámara de Neubauer.	107
Figura 25. Fotografía de un electrodo de Clark y esquema de su funcionamiento.	108
Figura 26. Diagrama de flujos de la extracción secuencial de macromoléculas de yodo en <i>Chlorella sorokiniana</i> .	110
Figura 27. Dietas usadas para evaluar el efecto del alga enriquecida en selenio en <i>Mus Musculus</i> .	121

ANEXO II: Índice de Tablas

Tabla 1. Concentración de selenio en alimentos.	31
Tabla 2. Límites de ingesta de yodo.	38
Tabla 3. Microalgas con capacidad de acumular metales.	54
Tabla 4. Diferentes isótopos de los elementos objeto de estudio, sus abundancias relativas y las principales interferencias que afectan a cada uno de ellos.	102
Tabla 5. Composición del medio M8-a modificado.	107
Tabla 6. Condiciones instrumentales usadas para SEC, AEC e ICP-ORS-MS.	112
Tabla 7. Condiciones instrumentales usadas para RPC y SEC-HPLC.	115
Tabla 8. Condiciones instrumentales usadas para RPC, SEC-HPLC y DI-ESI-QqQ-TOF-MS.	117
Tabla 9. Experimento de exposición de <i>C. sorokiniana</i> a mercurio y selenio.	118
Tabla 10. Condiciones experimentales óptimas para el análisis mediante RPC y Quiral.	119
Tabla 11. Condiciones experimentales óptimas para el análisis mediante 2D/SE-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-MS.	124

ANEXO III: Abreviaturas

2-DE	Electroforesis bidimensional
AA	Ácido araquidónico
AAS	Espectroscopía de absorción atómica
AEC	Cromatografía de intercambio aniónico
AES	Espectrometría de emisión atómica
AESAN	Agencia Española de la Seguridad Alimentaria y Nutrición
Alb	Albúmina
AsB	Arsenobetaina
AsC	Arsenocolina
BSA	Albúmina de suero bovino
CE	Electroforesis capilar
CG-ECD	Cromatografía de gases con detector de captura electrónica
CH ₃ SeH	Metilselenol
CID	Disociación inducida por colisión
CRM	Material de referencia
Cys	Cisteína
DIMS	Infusión directa
DIT	Diyodotirosina
DMA	Ácido dimetilarsínico
DMSe	Dimetilselenio
DMSeP	Dimetilselenonio
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ESI	Fuente de ionización por electrospray
EtHg	Etilmercurio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FQn	Fitoquelatina formada por n repeticiones del dipéptido γ -Glu-Cys
FQS	Fitoquelatín sintasa
FTIR	Resonancia infrarroja con transformada de Fourier
FUFOSE	<i>Funcional Food Science in Europe</i>
GC	Cromatografía de gases
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
IDA	Dilución isotópica
IDD	<i>Iodine deficiency disorders</i>
IE	Intercambio iónico
IEF	Isoelectroenfoque
ILSI	Sección Europea del <i>International Life Sciences Institute</i>

IT	Trampa de iones
LA	Ablación láser
MAA	Procedimientos analíticos multidimensionales
MALDI	Fuente de ionización-desorción láser asistida por matriz
MeHg	Metilmercurio
Met	Metionina
MIT	Monoyodotirosina
MMA	Ácido metilarsónico
<i>Mr</i>	Masa molecular
MS	Espectrometría de masas
nESI	Fuente de ionización nano-electrospray
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORC	Celda de colisión/reacción de tipo octapolo
OT	Orbitrap
PMSF	Fluoruro de fenilmetasulfonilo
PRC	Cromatografía de fase inversa
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
Q	Cuadrupolo
Q-IT	Cuadrupolo-trampa iónica
QqQ-TOF	Triple cuadrupolo tiempo de vuelo
Q-TOF	Cuadrupolo-tiempo de vuelo
RDA	Cantidad diaria recomendada
RMN	Resonancia magnética nuclear
rT3	Triyodotironina reversa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SeAlb	Selenoalbúmina
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño
SeCys	Selenocisteína
SeCys ₂	Selenocistina
SeMeSeCys	Selenometilselenocisteína
SeMet	Selenometionina
SeP	Selenoproteína P
SOD	Superóxido dismutasa
T2	Diyodotironina
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
TETRA	Ion tetrametilarsonio
Tg	Tiroglobulina
TMAO	Óxido de trimetilarsina
TMHA	Hidróxido de tetrametilamonio
TMSe	Trimetilselenonio
TPO	Peroxidasa tiroidea
TSH	Hormona estimulante del tiroides
UDSA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
UV-VIS	Ultravioleta-visible

XAS
XRF

Espectrometría de absorción de rayos X
Fluorescencia de rayos X

