

**TRANSFORMACIONES METABÓLICAS DE NANOPARTÍCULAS DE SELENIO POR PLANTAS Y BACTERIAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE UNA PLATAFORMA MULTITÉCNICA.**

Gustavo Moreno-Martín, Elena Espada-Bernabé, Beatriz Gómez-Gómez, María Eugenia León-González, Yolanda Madrid

Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica, Av. Complutense, s/n, 28040, Madrid, gusmoren@ucm.es

## 1. Introducción

El selenio es un oligoelemento esencial para los seres vivos con importantes funciones biológicas y bioquímicas. La toxicidad de este metaloide depende tanto de su concentración como de la forma química en la que se encuentre [1].

El interés por las nanopartículas de selenio (SeNPs) se debe fundamentalmente a su capacidad antioxidante y a su actividad antitumoral y anticarcinogénica [2]. En lo que respecta a su toxicidad, las SeNPs han demostrado tener una menor citotoxicidad que el resto de las especies, tanto de naturaleza orgánica (selenoaminoácidos) como inorgánica (selenito, seleniato), de este metaloide [3]. Actualmente, estas nanopartículas se están utilizando en diferentes sectores como la biomedicina y la industria agroalimentaria [4]. A pesar de su utilización, y como ocurre con otras nanopartículas de metales/metaloides, poco se sabe de su interacción con sistemas biológicos y medioambientales (plantas, microorganismos, etc) y las transformaciones que estas pueden ocasionar. En el caso de las SeNPs, estas se pueden transformar a especies orgánicas de selenio de naturaleza volátil y no volátil. Por otro lado, cuando ciertos microorganismos, como las bacterias, se ponen en contacto con concentraciones elevadas de selenio inorgánico, generalmente selenito, activan un mecanismo de detoxificación por el que reducen el selenito a selenio elemental en forma de nanopartículas. De esta manera, dicho mecanismo da lugar a un método de síntesis de SeNPs conocido como síntesis biogénica [5].

Desde el punto de vista analítico es necesario determinar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, independientemente de cuál sea su vía de síntesis. La caracterización en términos de tamaño, morfología, estado de agregación y/o concentración en número de partículas, se puede realizar con una elevada cantidad de técnicas entre las que caben destacar técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) e ICP-MS en su modo de detección de partículas individuales (spICP-MS) [6]. Asimismo, cuando las SeNPs se exponen a diferentes organismos vivos, como plantas y bacterias, estas se pueden transformar a especies orgánicas de selenio de naturaleza volátil y no volátil. Para la determinación

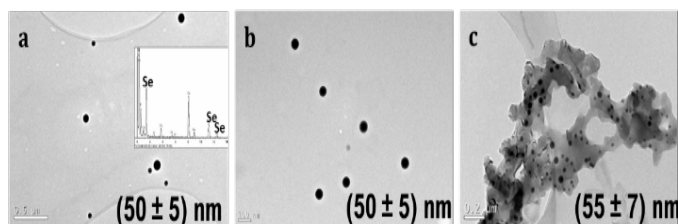
de dichas especies se recurre a técnicas cromatográficas (HPLC y GC) acopladas a diferentes detectores basados en la espectrometría de masas (ICP-MS y MS/MS) [7]. Por lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos. En primer lugar, evaluar las transformaciones metabólicas de las SeNPs, sintetizadas en el laboratorio y estabilizadas con quitosano, a especies orgánicas de selenio tanto de naturaleza volátil como no volátil después de su exposición a las especies de plantas *Raphanus sativus* y *Brassica juncea*, y las especies bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Y, en segundo lugar, llevar a cabo la caracterización de las SeNPs sintetizadas de manera biogénica por las especies bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* expuestas a elevadas concentraciones de selenio.

## 2. Estudio de especies orgánicas de selenio de naturaleza volátil y no volátil

### 2.1. Especies de plantas: *Raphanus sativus* y *Brassica juncea*

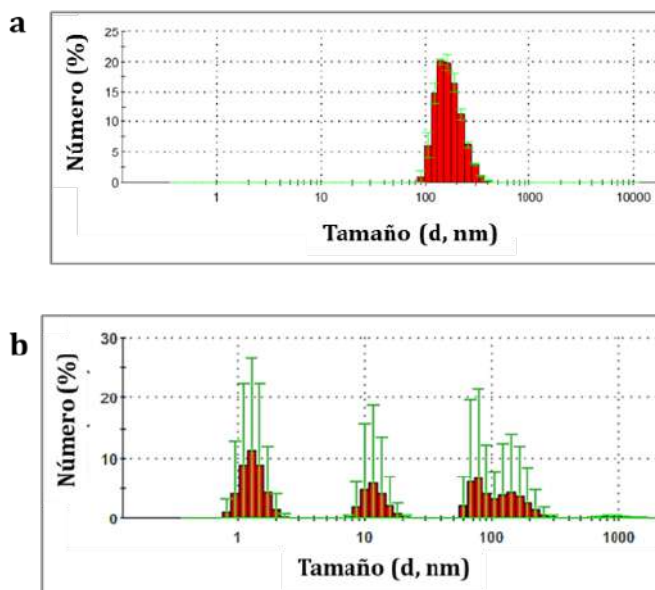
En lo que respecta al primer objetivo, las SeNPs se sintetizaron en el laboratorio en base a una reacción redox, utilizando selenito como precursor, ácido ascórbico como reductor, y quitosano como agente estabilizante [8].

Una vez sintetizadas, las SeNPs se caracterizaron por TEM y dispersión dinámica de luz (DLS) tanto en el medio de síntesis como en el medio de crecimiento Luria Bertani, empleado para el cultivo bacteriano, y en el medio de cultivo hidropónico, constituido por solución Hoagland y perlita utilizados como nutriente y sustrato, para el crecimiento de las plantas. En las micrografías obtenidas por TEM (Figura 1) se observaron SeNPs esféricas, monodispersas y con un tamaño del orden de los 50 nm en todos los medios en los que se llevó a cabo su caracterización.



**Figura 1.** Micrografías obtenidas por TEM para la caracterización de SeNPs en (a) medio de síntesis, (b) medio hidropónico y (c) medio Luria Bertani. Dentro de cada micrografía aparece el tamaño medio de las SeNPs.

Sin embargo, los análisis por DLS solo permitieron una correcta caracterización de dichas nanopartículas en el medio de síntesis y en el medio de cultivo hidropónico, dado que la complejidad del medio Luria Bertani interfirió en las medidas de dispersión de luz. De hecho, estas medidas mostraron que las SeNPs eran estables en los dos primeros medios al presentar un valor de potencial zeta de  $(-38 \pm 1)$  mV, y con un tamaño hidrodinámico de  $(191 \pm 6)$  nm (Figura 2a). En la Figura 2b se puede apreciar cómo el medio de cultivo bacteriano interfirió en las medidas impidiendo la correcta caracterización de las nanopartículas.



**Figura 2.** Análisis por DLS de las SeNPs en (a) medio de síntesis y medio de cultivo hidropónico y (b) medio de cultivo Luria Bertani.

Para evaluar las transformaciones metabólicas de las SeNPs tras su exposición a las especies *Raphanus sativus* y *Brassica juncea*, estas especies de plantas se germinaron primero entre 3 y 5 días. A continuación, se crecieron en el medio hidropónico durante unas 4-5 semanas. Y finalmente, mientras un grupo de estas especies de plantas se continuó creciendo durante 10 días en contacto con la disolución Hoagland (grupo control), otro grupo se cultivó en paralelo con  $5 \text{ mg L}^{-1}$  Se en forma de nanopartículas. En este punto y para

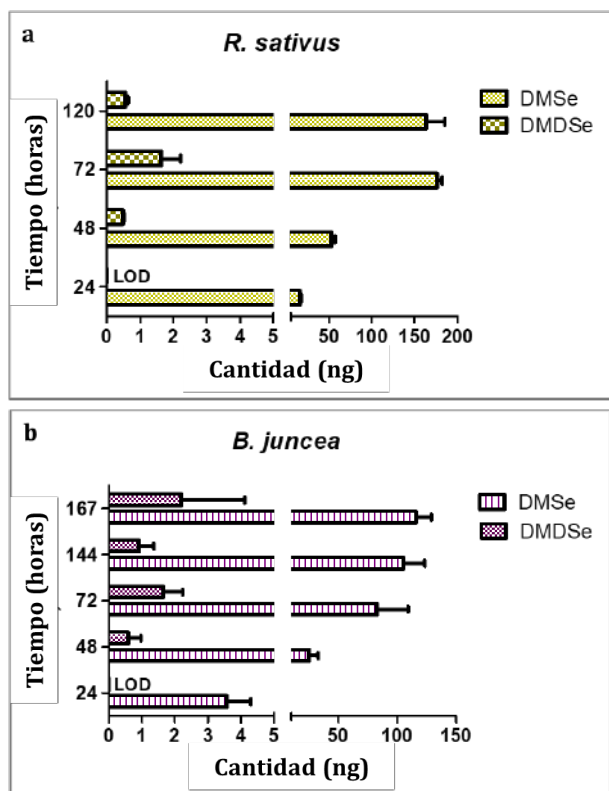
estudiar la formación de especies volátiles de selenio por parte de *Raphanus sativus* y *Brassica juncea*, ambas plantas fueron cubiertas por una caja de metacrilato con tres pasamuros en la parte superior, que permiten introducir las fibras de microextracción en fase sólida (SPME) a su través (Figura 3).



**Figura 3.** Sistema de extracción de las especies orgánicas de naturaleza volátil de selenio.

Para llevar a cabo la extracción y cuantificación de las especies volátiles formadas se siguió el procedimiento optimizado por Moreno-Martín *et al.*, [9]. Brevemente, las fibras de Carboxen/Polidimetilsiloxano se expusieron durante 26 min al espacio de cabeza de la caja de metacrilato para la extracción de las especies volátiles liberadas por las plantas. A continuación, sobre esa misma fibra, y en un vial diferente, se llevó a cabo la extracción del patrón interno durante otros 26 min. El patrón interno seleccionado fue dimetilsulfuro deuterado en los seis átomos de hidrógeno, al tener propiedades fisicoquímicas similares al dimetilselenio (DMSe), una de las especies objeto de estudio. Por último, los compuestos se desorbieron en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

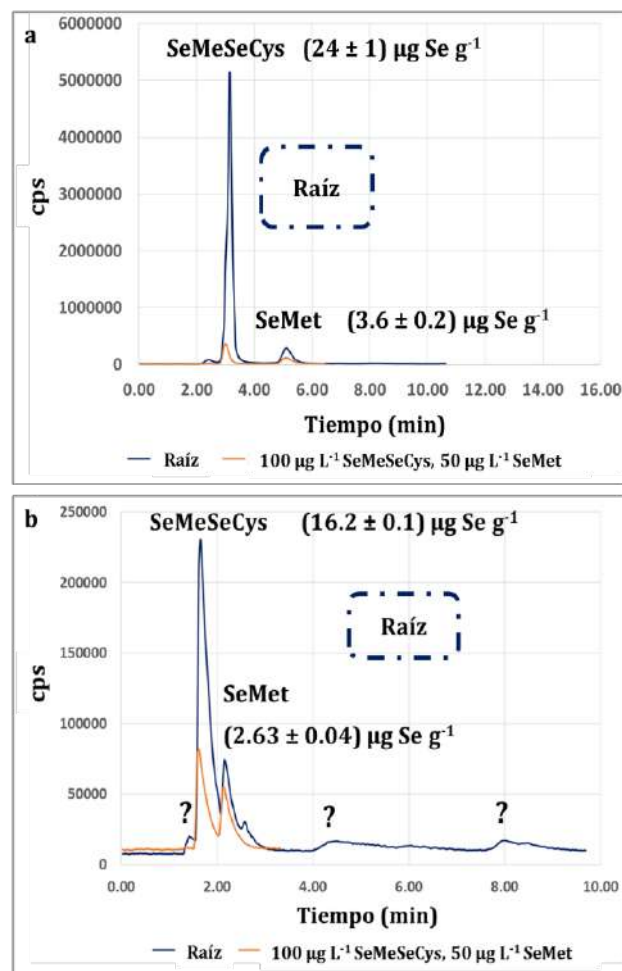
Los resultados de estos estudios mostraron que las SeNPs en contacto tanto *Raphanus sativus* como *Brassica juncea* eran transformadas a especies orgánicas de naturaleza volátil de selenio DMSe y dimetildiselenio (DMDS<sub>2</sub>). Aunque la primera de las especies se pudo cuantificar tras las primeras 24 h de contacto, en el caso de la segunda fueron necesarias 48 h de exposición para poder llevar a cabo su identificación y cuantificación. Asimismo, se observó que la formación de DMSe fue dependiente de la especie de planta al obtenerse cantidades significativamente superiores por la especie *Raphanus sativus* (Figura 4).



**Figura 4.** Cuantificación de las especies DMSe y DMDSe producidas por (a) *Raphanus sativus* y (b) *Brassica juncea* tras su crecimiento en presencia de SeNPs.

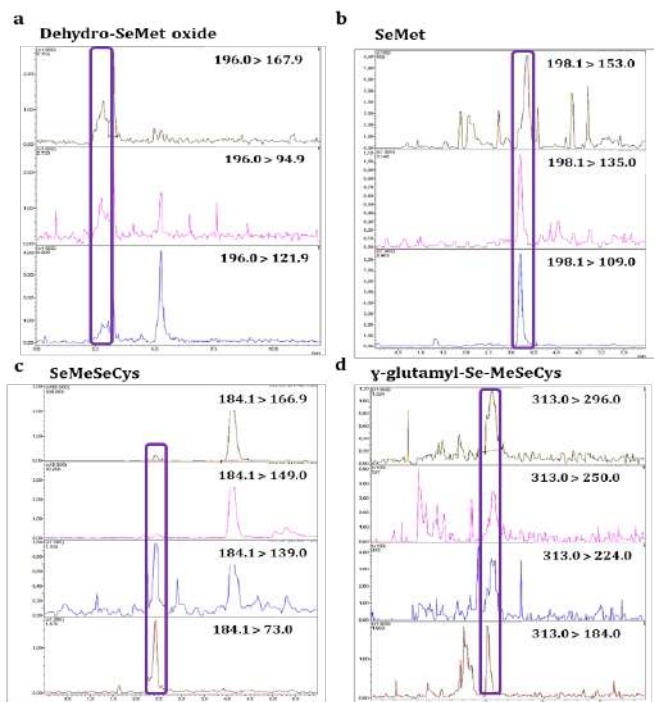
Para evaluar la formación de especies orgánicas de selenio de naturaleza no volátil por parte de ambas especies de plantas se siguió el procedimiento descrito por Moreno-Martín *et al* [10]. Brevemente, las plantas se separaron primero en raíz y parte aérea. A continuación, sobre cada una de esas partes se llevó a cabo un proceso de extracción enzimática con Proteasa XIV, seguido de un análisis del extracto por HPLC-ICP-MS. En cuanto al análisis cromatográfico, para identificar las especies de selenio formadas se utilizaron dos mecanismos de separación cromatográfica: uno basado en la cromatografía de intercambio aniónico utilizando la columna PRP-X100, y otro en la cromatografía de fase inversa a través de la columna EVO C18.

Los resultados obtenidos por ambos mecanismos de separación mostraron que, en ambas plantas, y tanto en la raíz como en la parte aérea, se encontraron mayoritariamente las especies de selenio no volátiles selenometionina (SeMet) y selenometilselenocisteína (SeMeSeCys). En la Figura 5 se observan los cromatogramas para la especie *Raphanus sativus* por ambos mecanismos de separación, siendo estos resultados análogos a los obtenidos para *Brassica juncea*. En la figura 5b se observan picos cromatográficos de especies de selenio que no se pudieron identificar debido a la falta de patrones comerciales para todas las especies de este elemento.



**Figura 5.** Análisis por HPLC-ICP-MS y cuantificación de las especies de selenio obtenidas en el extracto enzimático de la raíz de *Raphanus sativus* tras su análisis por (a) cromatografía de intercambio aniónico y (b) cromatografía de fase inversa. Las interrogaciones indican especies de selenio que no se pudieron identificar.

Para confirmar la formación de SeMet y SeMeSeCys, e intentar identificar alguna de las especies desconocidas obtenidas por HPLC-ICP-MS, el extracto se analizó por la técnica HPLC-ESI-MS/MS, debido a su compatibilidad con la fase móvil de la columna EVO C18 (0,1% ácido fórmico y 0,5% metanol a pH 3,2). Los resultados de este análisis, mostrados en la Figura 6, confirmaron la formación de SeMet y SeMeSeCys en la raíz y en la parte aérea de ambas plantas. Asimismo, se consiguió identificar uno de los picos desconocidos como la selenometionina oxidada, cuya formación se debe a la oxidación de la SeMet durante el proceso de extracción enzimática, y otro de los picos desconocidos se identificó con la especie  $\gamma$ -glutamyl-Se-metilselenocisteína, especie de selenio no proteogénica que permite a las plantas desarrollarse en presencia de elevadas concentraciones de selenio sin exhibir síntomas de toxicidad [10].



**Figura 6.** Análisis del extracto enzimático por HPLC-ESI-MS/MS para la confirmación e identificación de las especies (a) SeMetO, (b) SeMet, (c) SeMeSeCys y (d)  $\gamma$ -glutamyl-Se-metilselenocisteína.

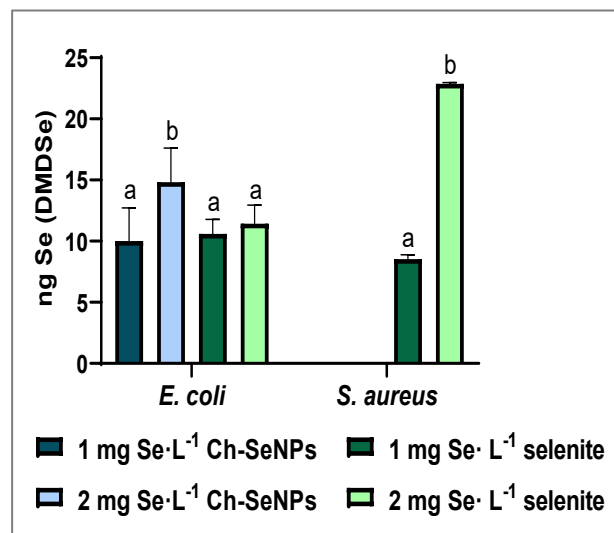
## 2.2. Especies bacterianas: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

La formación de especies orgánicas de selenio de naturaleza volátil por parte de las especies bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se evaluó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para las plantas, pero con ligeras modificaciones [11]. Brevemente, lo que diferencia ambos procedimientos es la temperatura de extracción, que en este caso se fijó a 37°C por ser la temperatura óptima de crecimiento de ambas especies bacterianas. Además, en este estudio se compararon las especies de selenio producidas cuando las bacterias se cultivaron en presencia de 1 y 2 mg L<sup>-1</sup> Se en forma de selenito y de nanopartículas. La extracción de la fracción volátil utilizando las fibras de SPME se realizó de acuerdo con el sistema mostrado en la Figura 7.



**Figura 7.** Sistema de extracción de las especies orgánicas de naturaleza volátil de selenio y de selenio-azufre.

El análisis de la fracción volátil tras aplicar el procedimiento descrito por Moreno-Martín *et al* [11] mostró que tanto *Escherichia coli* como *Staphylococcus aureus* produjeron las especies volátiles DMDSe y DMSe. La Figura 7 recoge cómo la formación de DMDSe por parte de *Escherichia coli* resultó ser independiente tanto de la concentración de selenio como de la forma química en la que este elemento se había añadido al medio de cultivo. Mientras que en el caso de *Staphylococcus aureus*, la formación de esta especie fue dependiente de dichos factores. Por otro lado, aunque la especie DMSe no se pudo cuantificar a las 24 h que duró el estudio, sí se pudo llevar a cabo su identificación en ambas especies bacterianas, con independencia de la forma química de selenio presente en el medio de cultivo.

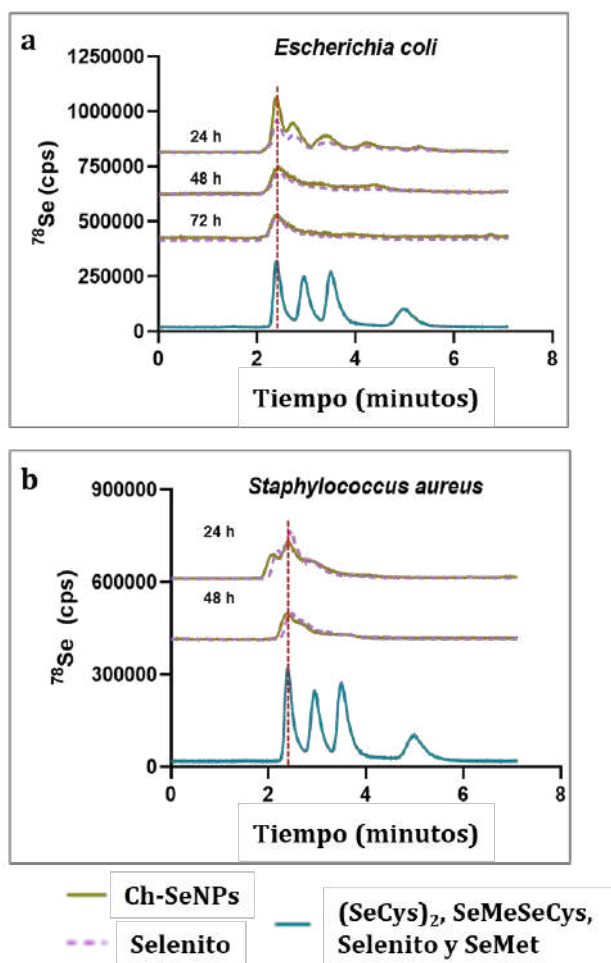


**Figura 7.** Cuantificación de la especie DMDSe producida por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* tras su crecimiento en presencia de SeNPs y selenito.

Como es sabido la presencia conjunta de selenio y azufre puede dar lugar a la formación de compuestos mixtos de ambos elementos [12]. La búsqueda de este tipo de especies en la fracción volátil a través de la librería NIST 2011 permitió identificar la especie sulfuro de dimetilselenio (DMSeS). Aunque esta especie ya había sido encontrada en bacterias cultivadas en presencia de selenito, este estudio demostró por primera vez su formación a partir de SeNPs.

En cuanto a la formación de especies orgánicas de selenio de naturaleza no volátil por parte de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se aplicó un procedimiento similar al descrito para las plantas. Sin embargo, en el caso de las bacterias es necesario realizar una ruptura previa de la pared celular bacteriana antes del proceso de

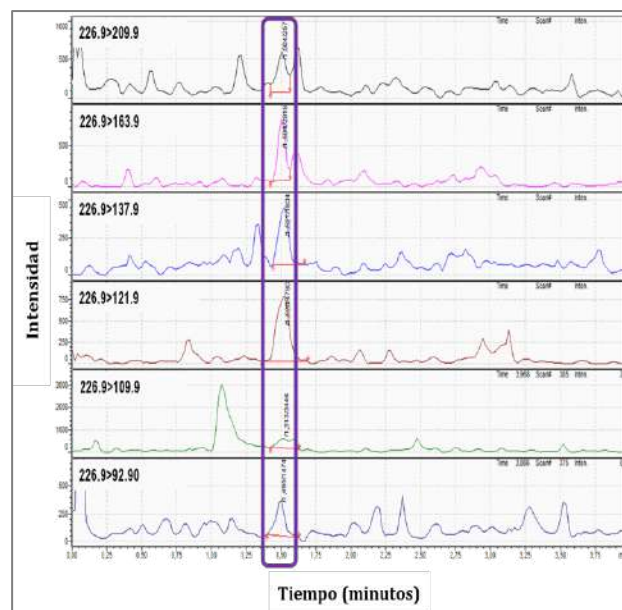
extracción enzimática. La ruptura de dicha pared se realizó utilizando dos mecanismos diferentes. Por un lado, un mecanismo enzimático basado en el empleo de lisozima, y por otro, un mecanismo de ruptura mecánica utilizando perlas de vidrio [13]. El análisis de estos extractos por HPLC-ICP-MS mostró que, aunque había variaciones en el perfil cromatográfico a lo largo del tiempo para ambos tipos de bacterias, la especie mayoritaria de selenio identificada fue la selenocisteína (SeCys), al coincidir su tiempo de retención con el estándar de selenocistina (Figura 8).



**Figura 8.** Especies de selenio obtenidas para (a) *Escherichia coli* y (b) *Staphylococcus aureus*, tras analizar el extracto enzimático, previa ruptura de la pared celular bacteriana con Lisozima, por HPLC-ICP-MS utilizando la columna PRP-X100.

Sin embargo, debido a la ausencia de un estándar comercial de SeCys, la identificación correcta de esta especie requiere de un proceso de carbamidometilación previo a la ruptura de la pared celular bacteriana, y a la extracción enzimática. Dicho proceso consiste en la reducción de los enlaces Se-Se; Se-S y S-S con ditiotretol, y la posterior protección de dichos grupos con iodoacetamida. El análisis de dicho extracto carbamidometilado por HPLC-ESI-MS/MS confirmó la formación de la SeCys carbamidometilada (Figura 9) y, por tanto, la formación de SeCys por parte

de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* tras ser cultivadas en presencia de selenito y SeNPs.

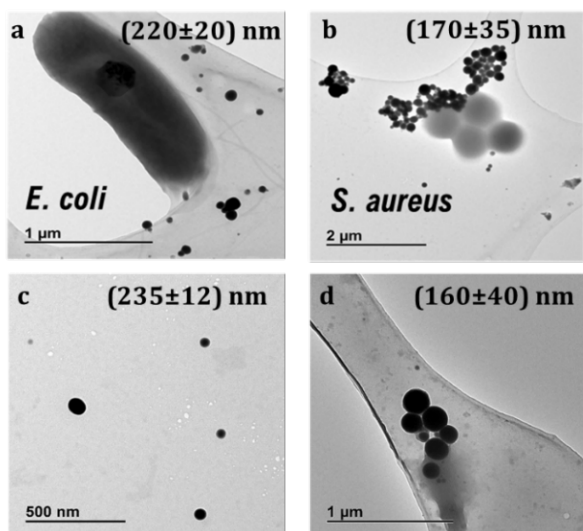


**Figura 9.** Confirmación de la especie SeCys carbamidometilada tras el análisis del extracto carbamidometilado por HPLC-ESI-MS/MS utilizando la columna EVO C18.

### 3. Síntesis biogénica y caracterización de SeNPs

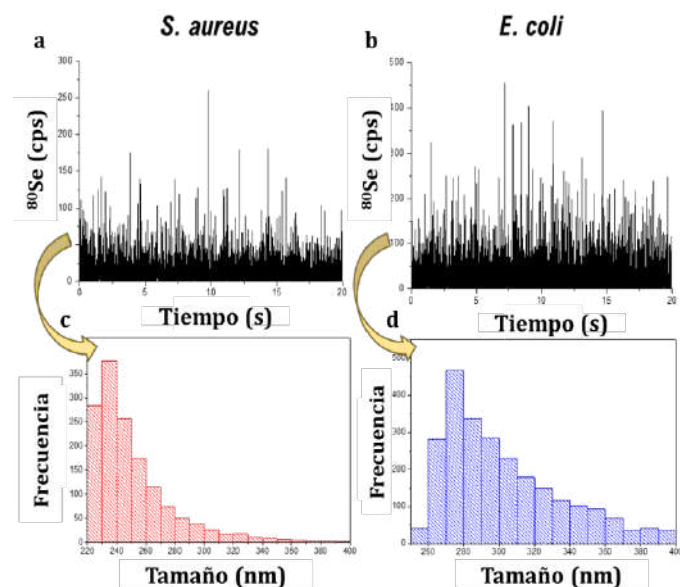
Con relación al segundo objetivo, durante el crecimiento de las especies bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en presencia de selenito se observó un cambio en la coloración del medio, que tornó de amarillo a rojo, tras 24 h de cultivo. Dicha coloración, que se intensificó con la concentración de selenio, es un indicativo de la formación de SeNPs de manera biogénica. Para comprobar la síntesis de este tipo de nanopartículas, los cultivos fueron analizados por TEM. Las micrografías (Figura 10a y 10b) mostraron nanopartículas esféricas, mayoritariamente monodispersas y con un tamaño alrededor de los 200 nm, que no mostró diferencias significativas entre ambas especies bacterianas.

Sin embargo, para una buena caracterización de las SeNPs, estas deben ser separadas previamente del medio de cultivo. Para ello se siguió el procedimiento descrito por Gómez-Gómez *et al* [13], basado en un mecanismo de disrupción mecánica que consiste en el uso de perlas de vidrio y la aplicación de diferentes ciclos con vortex, y baño de ultrasonidos para conseguir extraer y separar las SeNPs del cultivo bacteriano. Una vez aisladas las nanopartículas, su caracterización se llevó a cabo por las técnicas TEM y spICP-MS.



**Figura 10.** Caracterización de las SeNPs biogénicas sintetizadas por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (a) y (b) antes del proceso de extracción, y (c) y (d) después de la extracción, respectivamente. Cada micrografía contiene el tamaño medio las SeNPs.

Las micrografías obtenidas por TEM (Figura 10c y 10d) no mostraron diferencias significativas en el tamaño, morfología y estado de agregación de las SeNPs tras su extracción. En el análisis por spICP-MS fue necesario utilizar hidrógeno como gas de reacción para poder caracterizar las SeNPs (Figura 11) en términos de concentración en número de partículas y tamaño.



**Figura 11.** Time scans y distribuciones de tamaño correspondientes al análisis de las SeNPs biogénicas sintetizadas por (a) y (c) *Staphylococcus aureus* y, (b) y (d) *Escherichia coli*.

En este sentido y monitorizando el isótopo  $^{80}\text{Se}$ , se determinó la concentración en número de SeNPs que fue de  $(2,1 \pm 0,3) \cdot 10^{10}$  partículas  $\text{L}^{-1}$  para *Escherichia coli*, y de  $(4,7 \pm 0,4) \cdot 10^{11}$  partículas  $\text{L}^{-1}$  para *Staphylococcus aureus*. En lo que respecta al tamaño,

fue necesario llevar a cabo una corrección de dichos valores teniendo en cuenta la eficiencia de ionización del selenio. Dicha eficiencia, que resultó ser del  $(69 \pm 4) \%$ , se calculó utilizando un estándar comercial de SeNPs de 80 nm. Bajo esta corrección se obtuvieron tamaños de  $(208 \pm 33)$  nm y  $(173 \pm 19)$  nm para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Al comparar el tamaño medio de las SeNPs obtenido por TEM y spICP-MS no se obtuvieron diferencias significativas entre ambas técnicas.

#### 4. Conclusiones

Estos estudios han demostrado que las SeNPs son biotransformadas en compuestos orgánicos de selenio tanto de naturaleza volátil como no volátil tras su exposición a diferentes especies de plantas y de bacterias. En los que respecta a las plantas *Raphanus sativus* y *Brassica juncea*, estas fueron capaces de transformar dichas nanopartículas en las especies volátiles DMSe y DMDSe, y en las especies no volátiles SeMet, SeMeSeCys y  $\gamma$ -glutamyl-Se-metilselenocisteína, tanto en la raíz como en la parte aérea. Por su parte, las especies bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* transformaron las SeNPs en las mismas especies volátiles que se identificaron en las plantas, encontrándose una dependencia en la formación de dichas especies con la especie bacteriana y la forma de selenio incorporada al medio de cultivo. Asimismo, se identificó por primera vez la formación de la especie mixta de selenio y azufre DMSeS a partir de selenio en forma de nanopartículas. En lo que a las especies no volátiles se refiere, ambas especies bacterianas transformaron las dos formas químicas de selenio en SeCys, mayoritariamente. Por último, estas especies bacterianas mostraron su capacidad para sintetizar SeNPs de manera biogénica tras su crecimiento en presencia de selenito. Tras separar las nanopartículas del medio de cultivo bacteriano se consiguió llevar a cabo su caracterización en términos de tamaño, morfología, estado de agregación y concentración en número a partir de las técnicas TEM y spICP-MS.

#### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-114714RB-100), a la Comunidad de Madrid y Fondos Europeos por el proyecto (FSE y FEDER) (S2018/BAA-4393) y el contrato CT4/21-CT5/21 y a la Universidad Complutense de Madrid por el contrato de Periodo de Orientación Postdoctoral (CT42/18-CT43/18).



[13] Gómez-Gómez, B., Corte-Rodríguez, M., Perez-Corona, M.T., Bettmer, J., Montes-Bayón, M., Madrid, Y. (2020), *Anal. Chim. Acta*, 1128, 116-128.

<https://www.ucm.es/determinaciondetrazas>

## 6. Referencias

- [1] Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C. (2008) *Sci. Total Environ*, 400, 115-141.
- [2] Kurana, A., Tekula, S., Saifi, M.A., Venkatesh, P., Godugu, C. (2019) *Biomed. Pharmacother*, 111, 802-812.
- [3] Hosnedlova, B., Kepinska, M., Skalickova, S., Fernandez, C., Ruttkay-Nedecky, B., Peng, Q., Baron, M., Melcova, M., Opatrilova, R., Zidkova, J., Bjørklund, G., Sochor, J., Kizek, R. (2018) *Int. J. Nanomedicine*, 13, 2107-2128.
- [4] Kumar, A., Prasad, K.S. (2021) *J. Biotechnol*, 325, 152-163.
- [5] Martínez, F.G., Moreno-Martín, G., PEscuma, M., Madrid-Albarrán, Y., Mozzi, F. (2020), *Front. Bioeng. Biotechnol*, 8, 506.
- [6] Moreno-Martín, G., Pescuma, M., Pérez-Corona, T., Mozzi, F., Madrid, Y. (2017), *Anal. Chim. Acta*, 992, 34-41.
- [7] Pedrero, Z., Madrid, Y. (2009), *Anal. Chim. Acta*, 634, 135-152.
- [8] Palomo-Siguero, M., Verra, P., Echegoyen, Y., Nerin, C., Cámara, C., Madrid, Y. (2017), *Spectrochim. Acta B: At. Spectrosc*, 132, 19-25.
- [9] Moreno-Martín, G., Sanz-Landaluze, J., León-González, M.E., Madrid, Y. (2019), *Anal. Chim. Acta*, 1081, 72-80.
- [10] Moreno-Martín, G., Sanz-Landaluze, J., León-González, M.E., Madrid, Y. (2020), *Sci. Total Environ*, 725, 138453.
- [11] Moreno-Martín, G., Sanz-Landaluze, J., León-González, M.E., Madrid, Y. (2021), *Talanta*, 224, 121907.
- [12] Mejia, J., Montes-Bayón, M., Le Duc, D.L., Terry, N., Caruso, J.A. (2002), *Anal. Chem*, 74, 5837-5844.