

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL
MEDIO NATURAL (ETSIAMN)
GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

**USO DE BACTERIAS LÁCTICAS Y LEVADURAS PARA LA
REDUCCIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD ORAL DE ARSÉNICO
INORGÁNICO**
CURSO 2017-2018

TRABAJO FIN DE GRADO

Autora: Dña. María de los Ángeles Vivó Rico

Tutor: Dr. Rafael José Gavara Clemente

Tutoras externas: Dra. Vicenta Devesa i Pérez y Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Cotutora externa colaboradora: Dña. Gabriela de Matuoka e Chiocchetti

Valencia, junio 2018

TÍTULO: Uso de bacterias lácticas y levaduras para la reducción de la biodisponibilidad oral de arsénico inorgánico.

RESUMEN

El agua de bebida y los alimentos son la principal vía de exposición al arsénico inorgánico para la mayor parte de la población. El arsénico inorgánico [As(III) + As(V)] está catalogado por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer como cancerígeno para el hombre. Exposiciones crónicas a esta forma arsenical incrementan la prevalencia de cánceres de pulmón, vejiga, piel e hígado. En la actualidad se considera que aproximadamente 200 millones de personas están expuestas a concentraciones de arsénico inorgánico superiores a las ingestas recomendadas. Numerosas agencias internacionales de seguridad alimentaria y salud instan a reducir estas ingestas.

La eliminación del arsénico inorgánico del agua y de los alimentos con altos contenidos no es sencilla y restringir su consumo es inviable, debido a que algunas de estas fuentes dietarias son la base de la alimentación. Una alternativa para reducir la exposición es modificar la biodisponibilidad oral (cantidad del tóxico que llega a la circulación sistémica) del elemento tras la ingesta. La biodisponibilidad de las especies inorgánicas de arsénico está influenciada por diferentes factores, entre los que cabe destacar la forma química y la presencia de alimentos. De hecho, las estrategias basadas en componentes de la dieta ya han sido propuestas previamente para reducir la biodisponibilidad oral de este metaloide.

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de diferentes cepas de bacterias lácticas y *Saccharomyces cerevisiae* de reducir la biodisponibilidad del arsénico inorgánico. Esta reducción se puede conseguir por diferentes mecanismos: disminuyendo la cantidad del metaloide que después de la digestión gastrointestinal es solubilizado (bioaccesibilidad) y/o disminuyendo la cantidad que es transportada por las células intestinales (absorción). Para este fin, se ha evaluado inicialmente la capacidad de captación de As(III) y As(V) por las cepas de bacterias lácticas y levaduras y se ha analizado su efecto sobre la bioaccesibilidad de arsénico inorgánico aplicando un modelo *in vitro* de digestión gastrointestinal. Adicionalmente, se ha ensayado el efecto de estas cepas sobre la absorción empleando un modelo celular de epitelio intestinal (células Caco-2).

Los resultados muestran que la captación de As(III) y As(V) es baja para las levaduras ensayadas (< 10%) y que sólo existe una captación relevante de As(V) para algunas bacterias lácticas cuando se trabaja a concentraciones de fosfato ≤ 1 mM (25-40%). Esta reducida captación se evidencia en los ensayos de bioaccesibilidad donde se observa que las cepas no disminuyen la cantidad de arsénico solubilizado durante la digestión. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que ambos tipos de microorganismos son capaces de reducir el transporte de arsénico a través de la monocapa de células intestinales. Por tanto, podemos concluir que existen probióticos que reducen *in vitro* la absorción por células intestinales del arsénico presente en agua de bebida y alimentos, y que podrían reducir la biodisponibilidad del metaloide. Estos resultados deben confirmarse en animales de laboratorio con el fin de determinar si alguna de estas cepas puede ser empleada como futura estrategia de intervención en poblaciones de zonas altamente contaminadas.

Palabras clave: Arsénico inorgánico, bioaccesibilidad, absorción intestinal, biodisponibilidad, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus*, alimentos.

Autora: Dña. María de los Ángeles Vivó Rico

Tutor: Dr. Rafael José Gavara Clemente

Tutoras externas: Dra. Vicenta Devesa i Pérez y Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Cotutora externa colaboradora: Dña. Gabriela de Matuoka e Chiocchetti

Valencia, junio 2018

TITLE: Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce the oral bioavailability of inorganic arsenic.

ABSTRACT

Drinking water and food are the main sources of exposure to inorganic arsenic for most of the population. Inorganic arsenic [As(III) + As(V)] is cataloged by the International Agency for Research on Cancer as a human carcinogen. Chronic exposure to this arsenical form increases the prevalence of cancers of the lung, bladder, skin and liver. It is estimated that approximately 200 million people are exposed to concentrations of inorganic arsenic above the recommended intakes. Numerous international food safety and health agencies urge to reduce these intakes.

Elimination of inorganic arsenic from water and food with high contents is not simple and restricting its consumption is unfeasible, because some of these dietary sources are the basis of the diet. An alternative to reduce exposure is to decrease the bioavailability (amount of a compound that reaches the systemic circulation) of the element after ingestion. The bioavailability of inorganic arsenic is influenced by different factors, among which we can highlight the chemical form and the presence of food. In fact, strategies based on dietary components have already been proposed previously to reduce the oral bioavailability of this metalloid.

The objective of this project is to evaluate the capacity of different strains of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* to reduce the bioavailability of inorganic arsenic. This reduction can be achieved by different mechanisms: decreasing the amount of inorganic arsenic that after the gastrointestinal digestion is solubilized (bioaccessibility) and/or decreasing the amount that is transported by the intestinal cells (absorption). For this purpose, the capacity for uptake of As(III) and As(V) by the strains of lactic acid bacteria and yeasts has been evaluated and its effect on the bioaccessibility of inorganic arsenic has been analyzed by applying an *in vitro* model of gastrointestinal digestion. Additionally, the effect of these strains on absorption was tested using a cellular model of intestinal epithelium (Caco-2 cells)

The results show that the uptake of As(III) and As(V) is low for the yeasts tested (< 10%) and that there is only a relevant uptake of As(V) for some lactic acid bacteria at concentrations of phosphate in the media ≤ 1 mM (25-40%). This reduced uptake is evidenced in the bioaccessibility tests where it is observed that the bacterial strains do not reduce the amount of arsenic solubilized during digestion. However, it has been shown that both types of microorganisms are able to reduce the transport of arsenic through the monolayer of intestinal cells. Therefore, we can conclude that there are probiotics that could reduce *in vitro* the absorption by intestinal cells of the inorganic arsenic present in drinking water and food, and consequently that may reduce the bioavailability of this metalloid. These results should be confirmed in experimental animals in order to determine whether any of these probiotics can be used as future intervention strategies in populations of highly contaminated areas.

Keywords: inorganic arsenic, bioaccessibility, intestinal absorption, bioavailability, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus*, food.

Author: Miss María de los Ángeles Vivó Rico

Supervisor: Rafael José Gavara Clemente

External supervisors: Vicenta Devesa i Pérez, and Dr. Dinoraz Vélez Pacios

External co-supervisor: Miss Gabriela de Matuoka e Chiocchetti

Valencia, June 2018

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a mis directoras de este trabajo, Dra. Vicenta Devesa Pérez y Dra. Dinoraz Vélez Pacios por haberme permitido realizar el trabajo de fin de grado con ellas, por prestarme su ayuda, tiempo y conocimientos. Durante los meses que he estado en vuestro laboratorio he aprendido mucho de vosotras, ha sido un placer. ¡Muchas gracias!

Agradecer al Dr. Vicente Monedero García y Dr. Manuel Zúñiga Cabrera del grupo de Bacterias Lácticas por haberme proporcionado las cepas y haberme acompañado a lo largo de estos meses en todas las experiencias que he realizado.

Agradecer al IATA (Instituto de Agroquímica y de Tecnología de Alimentos) por haberme permitido usar sus instalaciones.

Agradecer a Dña. María Jesús Clemente Peiró por el trabajo previo realizado sobre la captación de arsénico y toda su información que me ha ayudado.

Agradecer a Dr. Rafael José Gavara Clemente por haberme ayudado durante estos meses.

Agradecer a mis compañeros de laboratorio (Mabel, Ale, Teresa, Gabi, Adri y Paloma) por haberme acompañado estos meses en el laboratorio, haberme ayudado en todo, haberme resuelto todas las dudas y por los buenos momentos que hemos pasado juntos. Ha sido un placer conocerlos.

Agradecer a mis amigas Nuria y Teresa por estar siempre ahí.

Y por último agradecer a mi familia: mis padres Ramón y María de los Ángeles, mis hermanos Moncho, Ángel y Belén y mis sobrinos Lucas y Martín. Gracias por aguantarme durante estos 4 años de carrera y durante la realización del trabajo de fin de grado.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO	3
3. METODOLOGÍA	4
3.1. Especies arsenicales	4
3.2. Alimentos	4
3.3. Cepas de bacterias lácticas y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
3.4. Evaluación de la captación de arsénico inorgánico por las bacterias lácticas y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
3.5. Evaluación del efecto de las bacterias lácticas sobre la bioaccesibilidad del arsénico inorgánico	6
3.6. Efecto de las bacterias lácticas y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la permeabilidad intestinal de arsénico inorgánico	7
3.6.1. Mantenimiento de los cultivos celulares	7
3.6.2. Evaluación de la permeabilidad aparente del arsénico inorgánico	7
3.6.3. Evaluación de la integridad de la monocapa celular durante los ensayos de transporte	9
3.7. Determinación de arsénico	9
3.8. Análisis estadístico	10
4. RESULTADOS	10
4.1. Estudio sobre la capacidad de bacterias lácticas y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de unir arsénico inorgánico	10
4.2. Factores que afectan a la captación de arsénico inorgánico	12
4.2.1. Concentración de las especies arsenicales	12
4.2.2. Viabilidad de los microorganismos	12
4.2.3. Medio de incubación	13
4.3. Efecto de las bacterias lácticas sobre la bioaccesibilidad de arsénico inorgánico	16
4.4. Efecto de las bacterias lácticas y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la permeabilidad intestinal de arsénico inorgánico	17
4.4.1. Efecto de las bacterias lácticas sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de As(III) y As(V)	17
4.4.2. Efecto de las cepas de <i>Saccharomyces</i> sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de As(III) y As(V)	18
4.4.3. Efecto de las bacterias lácticas y <i>Saccharomyces</i> sobre la permeabilidad del arsénico presente en alimentos	19
5. DISCUSIÓN	19
6. CONCLUSIONES	21
7. REFERENCIAS	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies arsenicales más frecuentes en muestras medioambientales y biológicas	1
Tabla 2. Cepas de bacterias lácticas ensayadas	4
Tabla 3. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ensayadas	5
Tabla 4. Condiciones instrumentales utilizadas en la cuantificación de arsénico mediante HG-AFS	10
Tabla 5. Captación de arsénico inorgánico (1 mg/L) por cepas de bacterias lácticas	11
Tabla 6. Captación de arsénico inorgánico (1 mg/L) por cepas de <i>S. cerevisiae</i>	11
Tabla 7. Captación de arsénico inorgánico (0.1 mg/L) por bacterias lácticas	12
Tabla 8. Captación de arsénico inorgánico (0.1 mg/L) por cepas de levaduras	12
Tabla 9. Efecto de la viabilidad de la cepa en la captación de arsénico inorgánico	13
Tabla 10. Captación de arsénico inorgánico por cepas de bacterias lácticas durante la digestión gastrointestinal	17
Tabla 11. Efecto de las bacterias lácticas sobre el transporte de As(III) en diferentes condiciones de exposición	17
Tabla 12. Efecto de las bacterias lácticas sobre el transporte de As(III) y As(V)	18
Tabla 13. Efecto de las cepas de <i>Saccharomyces</i> sobre el transporte de As(III) y As(V) en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX	18
Tabla 14. Efecto de las cepas de bacterias lácticas y levaduras sobre el transporte de arsénico desde arroz	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	6
Figura 2. Esquema del sistema bicameral empleado en los estudios de permeabilidad ..	8
Figura 3. Efecto del medio de incubación sobre la captación de arsénico inorgánico por bacterias lácticas	14
Figura 4. Efecto del medio de incubación sobre la captación de arsénico inorgánico por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
Figura 5. Efecto de la concentración de fosfato inorgánico en el medio sobre la captación de arsénico inorgánico por bacterias lácticas y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
Figura 6. Captación de As(V) por cepas de bacterias lácticas en un medio con fosfato inorgánico 1 mM	16

1. INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es un elemento natural que presenta propiedades intermedias entre metales y no metales. Perteneció al grupo VA de la tabla periódica y puede encontrarse en 4 estados de oxidación: elemental (0), trivalente (+3 o -3) y pentavalente (+5). Este metaloide forma parte de más de 200 minerales, siendo los principales la arsenopirita (FeAsS), el realgar (As₄S₄) y el oropimente (As₂S₃). Esta abundancia en la corteza terrestre es la causa de su elevada distribución en la biosfera. El arsénico presente en agua, suelos, sedimentos y aire llega a la cadena trófica y por ende a los alimentos, con factores de bioacumulación que varían en función del tipo de organismo considerado.

El arsénico se encuentra en la naturaleza en diferentes formas químicas, las cuales se pueden clasificar en dos grandes grupos: formas inorgánicas y orgánicas (tabla 1).

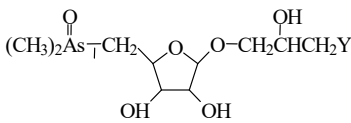
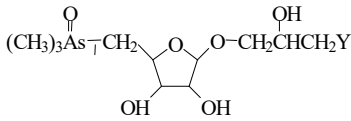
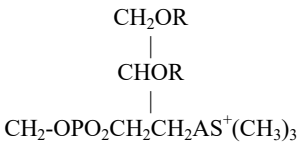
Especie	Fórmula
Inorgánicas	
Arsenito, As(III)	AsO ₃ ⁻³
Arseniato, As(V)	AsO ₅ ⁻³
Orgánicas	
Ácido monometilarsónico, MMA(V)	CH ₃ AsO ₃ ⁻²
Ácido monometilarsonioso, MMA(III)	CH ₃ As(OH) ₂
Ácido dimetilarsínico, DMA(V)	(CH ₃) ₂ AsO ₂ ⁻¹
Ácido dimetilarsinioso, DMA(III)	(CH ₃) ₂ As(OH)
Óxido de trimetilarsina, TMAO	(CH ₃) ₃ AsO
Ion tetrametilarsonio, TMA ⁺	(CH ₃) ₄ As ⁺
Arsenobetaina, AB	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ COOH
Trimetilarsoniopropionato, TMAP	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ CH ₂ COOH
Arsenocolina, AC	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ CH ₂ OH
Ácido dimetiltioarsínico, DMMTA(V)	(CH ₃) ₂ As(O)S
Ácido dimetilditioarsínico, DMDTA(V)	(CH ₃) ₂ AsS ₂
Arsenoazúcares dimetilados Y= -OH -OPO ₃ HCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH -SO ₃ H -OSO ₃ H	
Arsenoazúcares trimetilados Y= -OSO ₃ ⁻	
Arsenolipidos R: - H (glicerofosforilarsenocolina) R: -CO(CH ₂) _n CH ₃ (fosfatidilarsenocolina)	

Tabla 1. Especies arsenicales más frecuentes en muestras medioambientales y biológicas (JEFCA, 2011).

La toxicocinética y la toxicidad del arsénico dependen en gran parte de la forma química. Las especies orgánicas presentan una toxicidad muy variable. Algunas son consideradas inocuas, como la arsenobetaina (AB), la arsenocolina (AC) y el óxido de trimetilarsina (TMAO) (Sakurai *et al.*, 2001, 2002, 2004), mientras que el ácido dimetilarsínico [DMA(V)] está clasificado como cancerígeno en animales (IARC, 2004). El arsénico inorgánico [As(III) + As(V)] constituye la forma más tóxica encontrada hasta el momento en agua y alimentos. Esta especie está considerada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) como un carcinógeno para el hombre (Grupo 1, IARC, 2004). La exposición crónica a arsénico inorgánico está asociada con una mayor prevalencia de cánceres de pulmón, tracto urinario, hígado, riñón y piel (Chen *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1999). Además, se ha evidenciado un aumento de otras patologías como diabetes tipo II, problemas cardiovasculares (hipertensión) y cerebrovasculares (infartos), enfermedades respiratorias obstructivas crónicas y manifestaciones dérmicas no carcinogénicas (hipo e hiperpigmentaciones, queratosis palmar) (EFSA, 2009).

El hombre puede estar expuesto al arsénico inorgánico por inhalación, ingestión o contacto. La exposición vía dérmica o respiratoria es puntual y se limita principalmente a ámbitos laborales. Para la mayoría de la población, la principal vía de entrada es la oral debido al consumo de agua de bebida y alimentos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los contenidos de arsénico en agua destinada al consumo humano no deben sobrepasar los 10 µg/L (OMS, 2012). Sin embargo, se estima que en la actualidad alrededor de 200 millones de personas se abastecen de aguas que por causas de origen natural presentan concentraciones de arsénico muy superiores al valor recomendado. En muchos casos ésta es la única fuente de agua disponible para la población, que la utiliza para beber, cocinar y cultivar (OMS, 2012; Rahman *et al.*, 2012). Así ocurre en áreas de Argentina, Chile, México, Bangladesh, China e India, entre otras (Buchet *et al.*, 2000; Bundschuh *et al.*, 2012).

Para la población que consume agua de bebida con un contenido de arsénico inorgánico acorde a la recomendación de la OMS, los alimentos constituyen el principal aporte de arsénico inorgánico. De entre todas las matrices alimentarias que presentan elevados contenidos de esta forma química, posiblemente sean los cereales, y concretamente el arroz, los que suponen un mayor problema, debido a que se trata de alimentos de elevado consumo y en algunas poblaciones constituyen la base de la dieta. En su último informe, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) identifica el arroz, los productos pesqueros, las algas, el pan y el agua embotellada como las principales fuentes dietarias de arsénico inorgánico para la población europea (EFSA, 2009). EFSA indica que no se puede excluir un riesgo en consumidores frecuentes de arroz y productos derivados de algas y recomienda intentar reducir la ingesta de esta forma química de arsénico.

Se han evaluado diferentes formas de reducir la cantidad de arsénico inorgánico en aguas y alimentos. Los tratamientos de eliminación del arsénico en aguas utilizan diversos mecanismos, entre ellos la coagulación con sulfato de aluminio o sulfato férrico o la aplicación de ósmosis inversa (JEFCA, 2011). Muchos de ellos son de elevado coste, mantenimiento complicado y exigen una gran implicación de la población. Por ello, en muchas poblaciones rurales, dispersas y de bajos recursos económicos no se han instaurado métodos de descontaminación de arsénico y la población continúa expuesta a este tóxico. En alimentos, la eliminación es todavía más complicada. En matrices de origen vegetal, se han identificado algunos de los parámetros que influyen en la acumulación de arsénico y basándose en estos estudios se han abordado distintas estrategias para reducir la presencia del metaloide (Brammer, 2009; Bogdan y Schenk, 2008). Sin embargo, estas estrategias conllevan cambios en el tipo de cultivo o la creación de plantas modificadas genéticamente; por ese motivo son de difícil implementación.

Una forma alternativa para evitar una elevada exposición a través de los alimentos y el agua de bebida es reducir la cantidad del tóxico que una vez ingerido llega a la circulación sistémica (biodisponibilidad). La reducción de la biodisponibilidad se puede conseguir mediante diferentes mecanismos: disminuyendo el contenido que tras la digestión del agua o el alimento queda soluble para su absorción por la mucosa intestinal (bioaccesibilidad), reduciendo el transporte del

tóxico a través de la pared intestinal (absorción intestinal) o favoreciendo la eliminación vía biliar o urinaria. Estudios previos realizados por el grupo de Elementos Traza del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC) han mostrado que el empleo de determinados componentes de la dieta (glutati6n, cisteína, ácido tánico, sales de hierro) (Clemente *et al.*, 2016, 2017) conlleva reducciones importantes de la bioaccesibilidad y del transporte a través de la mucosa intestinal de las formas inorgánicas de arsénico. En este trabajo de fin de grado se ha continuado la búsqueda de elementos de la dieta que pudieran reducir la biodisponibilidad de arsénico inorgánico, evaluando en este caso la eficacia del uso de cepas de bacterias lácticas y de *Saccharomyces cerevisiae* de uso alimentario. Se trata en ambos casos de microorganismos con status GRAS (Generally Recognized As Safe), que en condiciones normales pueden ser introducidos en la dieta sin problemas derivados de su seguridad alimentaria (JECFA, 2011).

Una de las principales aplicaciones de las bacterias lácticas es su uso en la fermentación de productos lácteos y en la producción de vinos y cervezas. Además de ser buenos preservativos, gracias a la acción microbiana de alguno de los productos finales de su fermentación, también mejoran las características organolépticas y la calidad nutricional del producto. En los últimos años, también se están empleando como suplementos dietéticos o en la fabricación de alimentos funcionales. La mayor parte de microorganismos catalogados como probióticos (microorganismos vivos que se introduce en la dieta y que, tras ser ingeridos en cantidad suficiente, ejercen un efecto beneficioso en la salud) son bacterias ácido-lácticas, especialmente del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Ljungh y Wadström, 2006).

Las levaduras del género *Saccharomyces*, especialmente *S. cerevisiae*, también han sido empleadas desde la antigüedad en numerosos procesos fermentativos dentro de la industria alimentaria. Recientemente, ciertas cepas de *S. cerevisiae* están siendo usadas como suplementos alimenticios debido a su alto contenido en vitaminas, minerales y proteínas (Ferreira *et al.*, 2010) y como agentes probióticos en el tratamiento de diarreas crónicas, recurrentes o agudas (Czerucka *et al.*, 2007; McFarland, 2010).

Estudios previos muestran que algunas de estas cepas tienen capacidad de unir cationes metálicos, incluso algunos elementos de naturaleza ani6nica como el cromo (Monachese, 2012; Chiocchetti *et al.*, 2018). La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo por contacto de los microorganismos con agua adicionada con el t6xico y la posterior determinaci6n de la captaci6n celular. La interacci6n de la bacteria láctica o levadura con elementos traza t6xicos en las condiciones en las que se produce la digesti6n gastrointestinal o en presencia de alimentos sólo se ha confirmado para las formas de mercurio más habituales en alimentos (Jadán-Piedra *et al.*, 2017a, 2017b).

2. OBJETIVO

El objetivo de este proyecto es la búsqueda de cepas de *Lactobacillus* y *Saccharomyces cerevisiae* capaces de reducir la cantidad de arsénico existente en agua de bebida y alimentos que puede absorberse en el tracto intestinal y llegar a la circulaci6n sistémica (biodisponibilidad). Este objetivo general se va a alcanzar a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluaci6n de la capacidad de cepas de *Lactobacillus* y *Saccharomyces cerevisiae* de unir las especies de arsénico inorgánico en disoluci6n acuosa.
2. Evaluaci6n de la eficacia de cepas de *Lactobacillus* y *Saccharomyces cerevisiae* en la reducci6n de la bioaccesibilidad de arsénico inorgánico desde agua y alimentos.
3. Evaluaci6n de la eficacia de cepas de *Lactobacillus* y *Saccharomyces cerevisiae* en la reducci6n de la cantidad de arsénico inorgánico absorbida por las células intestinales.

3. METODOLOGÍA

3.1. Especies arsenicales

El patrón de As(V) (1000 mg/L, As₂O₅) fue adquirido a Merck. El patrón de As(III) (1000 mg/L) se preparó por disolución de 1.320 g de As₂O₃ (Riedel de Haën) en 25 mL de 20% (m/v) KOH (Panreac), neutralización con 20% (v/v) H₂SO₄ (Merck) y dilución a 1 L con 1% (v/v) H₂SO₄.

3.2. Alimentos

Se utilizaron muestras de arroz, las cuales se cocinaron en una disolución patrón de 3 mg/L de As(V) hasta sequedad (proporción muestra/agua: 1/3). No se usaron ingredientes adicionales en el proceso de cocción. Las muestras cocinadas fueron homogenizadas y almacenadas a -20 °C hasta el momento de su análisis.

3.3. Cepas de bacterias lácticas y *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de bacterias lácticas empleadas se muestran en la tabla 2. Las bacterias se crecieron en medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) (BD Difco) a 30 °C en condiciones estáticas. Para los ensayos, la cepas se lavaron con tampón fosfato salino (PBS, Hyclone) y tras centrifugación (4000 rpm, 10 min, 4 °C), se resuspendieron en el medio adecuado para el análisis.

Designación	Nombre	Origen
BL7	<i>L. brevis</i> DSMZ ^a 1268	Cerveza
BL10	<i>L. acidophilus</i> ATCC ^b 9224	Leche agria
BL17	<i>L. acidophilus</i> ATCC ^b 4356	Intestino humano
BL23	<i>L. casei</i> ^c	Cepa de laboratorio
BL36	<i>L. brevis</i> ATCC ^b 14869	Intestino humano
BL73	<i>L. acidophilus</i> CNRZ ^c 55	Heces de rata
BL75	<i>L. acidophilus</i> CNRZ ^c 217	Flora digestiva rata
BL166	<i>L. plantarum</i> WCFS1 ^f	Intestino humano
BL221	<i>L. crispatus</i> M247 ^f	Heces recién nacidos
BL278	<i>L. crispatus</i> DSMZ ^a 20584	Lágrimas
BL279	<i>L. acidophilus</i> CECT ^d 4529	Intestino de pollo
BL280	<i>L. acidophilus</i> CECT ^d 4179	Heces de rata
LGG	<i>L. rhamnosus</i> ATCC ^b 53103	Intestino humano
LPP ⁺	<i>L. plantarum</i> ^c	Cepa de laboratorio

Tabla 2. Cepas de bacterias lácticas ensayadas. ^aDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, ^bAmerican Type Strain Culture Collection, ^cColección del laboratorio de bacterias lácticas y probióticos [Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)], ^dColección Española de Cultivos Tipo (CECT), ^eCentre National de Reserches Zootechniques (CNRZ), ^fcolecciones de otros laboratorios.

Las cepas de *S. cerevisiae* se describen en la tabla 3. Las levaduras fueron mantenidas en medio YPD (Yeast Peptone Dextrosa) constituido por 0.5% (m/v) de extracto de levadura, 1% (m/v) de peptona bacteriológica y 2% (m/v) de glucosa (Sigma). Para los ensayos se lavaron con PBS y tras centrifugación (4000 rpm, 2 min), se resuspendieron en el medio de ensayo.

Cepa	Nombre	Características
2	BY4743	Cepa de laboratorio diploide
3	T73	Cepa vínica
4	VRB	Cepa productora de manoproteínas
7	Ultralevura	Cepa dietética (UPSAMÉDICA SL)
8	YPS128	Cepa silvestre americana
9	UWOPS03-461.4	Cepa silvestre de Malasia
10	Kyokai 6	Cepa de sake

Tabla 3. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ensayadas. Cepas procedentes del laboratorio de Biología de sistemas en levaduras de interés biotecnológico (IATA-CSIC).

3.4. Evaluación de la captación de arsénico inorgánico por las bacterias lácticas y *Saccharomyces cerevisiae*

Se llevó a cabo una incubación de las cepas de bacterias lácticas (densidad óptica, DO 10) y las cepas de *S. cerevisiae* (DO 4) con As(III) y As(V) (ambos a 1 mg/L) a 37 °C durante 4 h en PBS. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 2 min. Los contenidos de arsénico en el sobrenadante y en el pellet celular se analizaron según el protocolo descrito en la sección 3.7. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron una baja captación de arsénico por los microorganismos. Para determinar las posibles causas de este fenómeno se evaluaron una serie de factores que podían afectar la interacción arsénico/microorganismo.

A) Influencia de la concentración de As(III) y As(V). La incubación se llevó a cabo en PBS durante 4 h, empleando dos concentraciones de las especies arsenicales (0.1 y 1 mg/L).

B) Influencia de la viabilidad celular. Las bacterias o levaduras fueron tratadas térmicamente a 80 °C durante 30 min. Posteriormente se adicionaron a patrones de As(III) y As(V) (1 mg/L) preparados en PBS. Estas mezclas se incubaron a 37 °C durante 4 h.

C) Influencia del medio de incubación. La incubación se realizó sustituyendo el medio PBS por NaCl 0.9% (m/v) sin o con la adición de glucosa (20 mM, Sigma) o de concentraciones crecientes de fosfato sódico (0.01, 0.1, 1 y 10 mM, Merck)

En todos estos ensayos se empleó la cepa LPP⁺ de *Lactobacillus* y la cepa 10 de *S. cerevisiae*, por tratarse de las cepas que presentaban una mayor acumulación de arsénico.

3.5. Evaluación del efecto de las bacterias lácticas sobre la bioaccesibilidad del arsénico inorgánico

Se empleó un método estático de digestión que simula las etapas gástrica e intestinal del proceso de digestión humana (figura 1; Laparra *et al.*, 2003). En la aplicación del método se utilizaron los siguientes equipos: pH-metro (Consort modelo C830), agitador orbital (Stuart modelo SSL1), centrífuga (RC-5B Superspeed Refrigerated Centrifuge, Sorvall, Du Pont).

Etapa gástrica. Se introdujo en un erlenmeyer el patrón de As(III) y As(V) preparado en agua (concentración 1 mg/L, volumen 10 mL) en presencia o ausencia de las bacterias a una densidad óptica de 10. Se ajustó el pH a 2 con HCl (Merck) y se adicionó pepsina porcina (Sigma, actividad enzimática 944 U/mg de proteína). Se preparó una disolución de pepsina al 10% (m/v) en HCl 0.1 mol/L y se adicionó al erlenmeyer el volumen necesario para proporcionar 2 mg pepsina/10 g de disolución. Posteriormente, el erlenmeyer se tapó con parafilm y se incubó en agitación (120 rpm) a 37 °C durante 2 h.

Etapa intestinal. Se ajustó el pH del digerido gástrico a 6.5 utilizando NH₃ (Scharlau, Scharlab) y se adicionó pancreatina porcina (Sigma, actividad equivalente a 4 × especificaciones de Farmacopea de EEUU/mg de pancreatina) y extracto biliar porcino (Sigma, glicina y taurina conjugadas con ácido desoxicólico y otras sales biliares). Se preparó una disolución de pancreatina porcina al 0.4% (m/v) y de extracto biliar porcino al 2.5% (m/v) en NH₄CO₃ 0.1 mol/L (Merck). Se adicionó al digerido el volumen necesario para proporcionar 0.5 mg de pancreatina/10 g de disolución y 3 mg de extracto biliar/10 g de disolución. La mezcla se tapó con parafilm y se incubó nuevamente en agitación (120 rpm) durante 2 h a 37 °C. Una vez finalizada la etapa intestinal, el digerido se centrifugó (10000 rpm/30 min/4 °C) para separar la fracción soluble (bioaccesible) y el residuo.

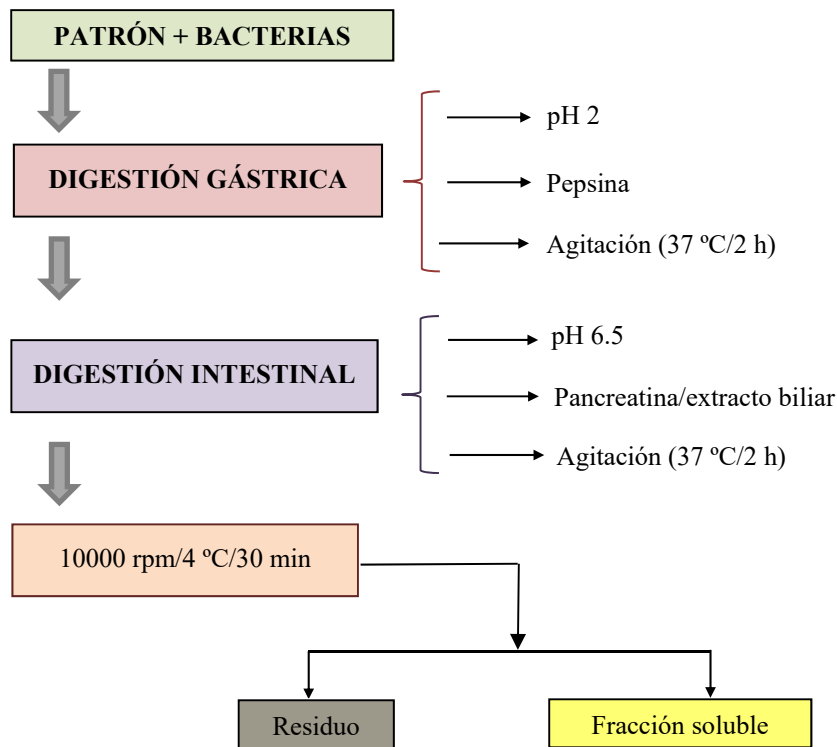


Figura 1. Esquema del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Modelo empleado para la determinación de la bioaccesibilidad de arsénico en patrones acuosos y alimentos.

En la fracción soluble se cuantificó el contenido de arsénico utilizando la metodología que se describe en la sección 3.7. Para la evaluación de la bioaccesibilidad de arsénico se utilizó la ecuación 1.

$$\text{Bioaccesibilidad} = \frac{\text{arsénico en la fracción bioaccesible}}{\text{arsénico en el patrón acuoso}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

3.6 Efecto de las bacterias lácticas y *Saccharomyces cerevisiae* en la permeabilidad intestinal de arsénico inorgánico

3.6.1. Mantenimiento de los cultivos celulares

Se emplearon dos líneas celulares humanas del epitelio colónico: NCM460 (células no transformadas) y HT29-MTX (células mucosecretoras procedentes de un adenocarcinoma). La línea NCM460 fue adquirida a Incell Corporation y mantenida en frascos de 75 cm² a los que se añadió 10 mL de medio modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido en glucosa (4.5 g/L) y glutamina (0.87 g/L) a pH 7.2. El medio fue suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS), 1 mM de piruvato sódico, 10 mM de N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomina y 0.0025 mg/L de anfotericina B (NCM-DMEMc). Los ensayos se realizaron con células entre los pases 17 y 25.

La línea celular HT29-MTX fue proporcionada por la Dra. Tecla Lesuffleur (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM UMR, Francia). El mantenimiento celular fue realizado en DMEM suplementado con 10% FBS, piruvato sódico 1 mM, HEPES 10 mM, 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomina y 0.0025 mg/L de anfotericina B (HT-DMEMc). Los ensayos se realizaron con células entre los pases 17 y 25.

Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 95% de humedad relativa y un flujo de CO₂ de 5%, cambiando el medio cada 3 días. Cuando la monocapa celular alcanzó 80-90% de confluencia, se realizó el pase mediante la adición de una disolución de tripsina (0.5 mg/mL) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA 0.2 mg/mL). Las células se sembraron a una densidad de 1.3×10^4 células/cm² en frascos de 75 cm². Todos los reactivos utilizados en el mantenimiento de las líneas celulares se obtuvieron de Hyclone.

3.6.2. Evaluación de la permeabilidad aparente del arsénico inorgánico

Los ensayos se realizaron en placas de 12 pocillos con insertos de membrana de poliéster (diámetro 12 mm, tamaño de poro 0.4 µm, Transwell®, Corning). En este sistema, las células se siembran sobre la membrana porosa del inserto que separa el pocillo en dos compartimentos: el apical (superior) que correspondería al lumen intestinal y el basolateral (inferior), que representaría la cavidad serosa donde llegan los compuestos tras la absorción intestinal (Figura 2).

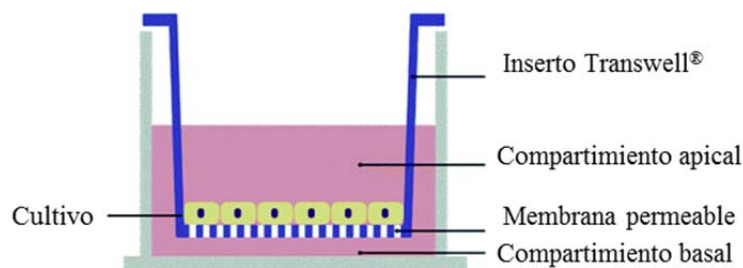


Figura 2. Esquema del sistema bicameral empleado en los estudios de permeabilidad.

La suspensión celular a una densidad de 1.8×10^5 células/cm² en DMEM suplementado se añadió al lado apical para producir co-cultivos NCM460/HT29-MTX (80/20). En el lado basolateral se adicionó 1.5 mL de DMEM suplementado. Las células se mantuvieron en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de O₂ a 37 °C, con cambio de medio cada 3 días hasta el momento de ensayo (9-10 días post-siembra).

Los ensayos de permeabilidad se llevaron a cabo a 37 °C en dirección apical-basolateral (sentido absorbivo). Tras retirar el medio de mantenimiento de los compartimentos apical y basolateral, se adicionó al compartimiento apical 0.5 mL de los patrones de As(III) y As(V) (0.75 mg/L) preparados en HBSS con 10 mM HEPES o la fracción bioaccesible de arroz (obtenida tal y como se describe a continuación) con o sin la adición de las bacterias lácticas (DO 0.6, Tabla 2) o las cepas de levaduras (DO 1, Tabla 3) a probar. En el compartimiento basolateral se adicionaron 1.5 mL de medio HBSS con 10 mM HEPES.

La fracción bioaccesible de arroz cocinado se obtuvo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.5, con ligeras modificaciones. El alimento (5 g) se pesó en el erlenmeyer y se llevó a un volumen final de digestión de 50 mL con agua desionizada. Las etapas gástrica e intestinal se realizaron tal y como se indica en el protocolo. La fracción soluble procedente de la digestión gastrointestinal no puede adicionarse directamente al cultivo celular. Previamente es necesario inactivar los enzimas proteolíticos utilizados en el proceso y ajustar la osmolaridad de las fracciones solubles a valores fisiológicos que permitan conservar la integridad de la monocapa celular durante el ensayo. Para inactivar las proteasas, la fracción bioaccesible se sometió a un tratamiento térmico a 90 °C durante 5 min. A la fracción soluble inactivada, se le adicionó glucosa (5 mM concentración final, Sigma) para favorecer el mantenimiento de la viabilidad y actividad celular durante los ensayos. Finalmente, la osmolaridad se ajustó a valores entre 270-310 mOsmol/kg, mediante la adición de NaCl 1 M (Panreac), empleando un osmómetro crioscópico Automatic Micro-Osmometer Löser (Löser).

A los tiempos establecidos (30, 45, 60 y 120 min para disoluciones patrón; 30, 45, 60 y 75 min para las fracciones bioaccesibles), se retiraron alícuotas (1 mL) del compartimiento basolateral y se sustituyeron por un volumen igual de medio fresco (HBSS con 10 mM HEPES). En las alícuotas recogidas se procedió a la cuantificación de arsénico, tal y como se describe en la sección 3.7.

Los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) se calcularon utilizando la ecuación 2.

$$P_{app} = \frac{dC}{dt} \times \frac{V_r}{ACo} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde,

dC/dt es el flujo ($\mu\text{g/s}$) determinado por la pendiente lineal de la ecuación que rige la variación de las concentraciones de arsénico, corregidas con la dilución, frente al tiempo.

V_r es el volumen del compartimento receptor (1.5 mL).

A es la superficie ocupada por la monocapa celular (1.12 cm^2).

C_o es la concentración inicial de las especies arsenicales añadida en el compartimento dador ($0.75 \mu\text{g/mL}$ en los ensayos con patrones).

3.6.3. Evaluación de la integridad de la monocapa celular durante los ensayos de transporte

Para determinar la validez de los ensayos de transporte es necesario evaluar la integridad de la monocapa celular durante el procedimiento. Esta se evaluó por determinación de la P_{app} de Lucifer Yellow (LY, Sigma), compuesto fluorescente que se transporta principalmente por vía paracelular y cuyo transporte es un indicativo de la integridad. El LY se añadió a una concentración de $100 \mu\text{M}$ en el compartimento apical al mismo tiempo que los tratamientos. La fluorescencia del LY en las alícuotas recogidas a cada tiempo del lado basolateral se midió empleando un lector de microplacas (PolarSTAR OPTIMA reader, BMG-Labtech) a una longitud de onda de excitación/emisión de $485/520 \text{ nm}$. El cálculo del P_{app} se realizó aplicando la ecuación 2. Los ensayos se consideraron válidos cuando los valores de P_{app} fueron $\leq 1 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$.

3.7. Determinación de arsénico

Para el análisis de arsénico total se procedió a la mineralización de las muestras por vía seca y posterior cuantificación por espectrofotometría de fluorescencia atómica con generación de hidruros (HG-AFS, Excalibur 10.044; PSA). Todas las muestras del presente trabajo (alimentos, fracciones bioaccesibles, células intestinales, bacterias, levaduras y medios de incubación y cultivo) fueron mineralizadas empleando este método. La cantidad mineralizada de cada muestra varió en función de la naturaleza de la matriz y de la concentración de arsénico esperada.

La mineralización se llevó a cabo adicionando a la muestra, 1-2.5 mL de agente de mineralización [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 20% m/v (Panreac) + MgO 2% m/v (Merck)] y 5 mL de HNO_3 (14 mol/L) (Merck). La mezcla se evaporó a sequedad en un baño de arena termostataado (Raypa, modelo PL 5125, Selecta) y posteriormente se mineralizó en un horno mufla (Heraeus, modelo K 1253) aplicando un ciclo temperatura-tiempo en el que tras una subida paulatina de la temperatura ($50 \text{ }^\circ\text{C/h}$), las muestras se mantuvieron a $450 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 h. Tras el proceso de mineralización, las cenizas se disolvieron en HCl 6 mol/L y en una disolución reductora [5% m/v KI (Panreac) y 5% m/v ácido ascórbico (Merck)]. La proporción de reductor adicionado con respecto al volumen final de disolución fue de 1:5. Transcurridos 30 minutos, la disolución se filtró a través de papel Whatman No. 1 y se llevó a volumen final con HCl 6 mol/L. Las condiciones instrumentales para la cuantificación de arsénico mediante HG-AFS se detallan en la tabla 4. El control de calidad de la cuantificación se realizó a través del análisis de la muestra de referencia certificada con un contenido en arsénico de $30.2 \pm 0.293 \mu\text{g/L}$ (RTC QCI-049-1, LGC Standards).

Espectroscopía de fluorescencia atómica	
Muestra	9 mL/min
Disolución reductora	NaBH ₄ 1.2% (m/v) en NaOH 0.1 M (m/v). Flujo 4 mL/min
Disolución ácida	HCl 37.5% (v/v). Flujo 9 mL/min
Gas transportador	Argón. Flujo 300 mL/min
Gas de secado	Aire. Flujo 2.5 L/min
Corriente primaria	27.5 mA
Corriente de estímulo	35.0 mA
Tiempo de demora	10 s
Tiempo de medida	20 s
Tiempo de retorno	40 s

Tabla 4. Condiciones instrumentales utilizadas en la cuantificación de arsénico mediante HG-AFS.

3.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó aplicando la prueba t-student o el análisis de la varianza con un sólo factor (ANOVA) con comparaciones múltiples post hoc mediante la prueba de Tukey HSD (SigmaPlot, versión 13.5). Las diferencias se consideraron significativas para $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio sobre la capacidad de bacterias lácticas y *Saccharomyces cerevisiae* de unir arsénico inorgánico

Las tablas 5 y 6 muestran la cantidad de arsénico captada por las bacterias lácticas y las levaduras respectivamente tras un contacto con disoluciones salinas (PBS) de As(III) y As(V) (1 mg/L) durante 4 h. Los resultados muestran que ninguna de las cepas evaluadas tiene una elevada capacidad de retener arsénico inorgánico. Los porcentajes de retención no superan el 6% del arsénico adicionado inicialmente al medio. Este hecho contrasta con los datos obtenidos para otros elementos traza tóxicos (Jadán-Piedra *et al.*, 2017 a,b), incluso con las captaciones reportadas para As(III) por *Lactobacillus acidophilus* (Singh y Sarma, 2010) y *S. cerevisiae* procedente de los residuos de una cervecera (Wu *et al.*, 2012). Con el fin de caracterizar el tipo de interacción entre el metaloide y las bacterias y levaduras, y poder incrementar las retenciones obtenidas, se planteó el estudio de los factores que pudiesen influir en la captación del metaloide por parte de ambos tipos de microorganismos (apartado 4.2).

Cepa	As(III)		As(V)	
	Cantidad (ng)	%	Cantidad (ng)	%
BL7	56.2 ± 6.3	0.5	7.2 ± 0.1	0.1
BL10	183.6 ± 1.5	1.9	72.0 ± 16.1	0.8
BL17	317.1 ± 25.7	3.3	48.9 ± 2.1	0.6
BL23	61.3 ± 5.8	1.2	48.8 ± 15.4	0.9
BL36	314.3 ± 14.4	3.0	232.2 ± 4.9	2.9
BL73	225.8 ± 10.1	2.9	47.8 ± 8.7	0.5
BL75	229.0 ± 11.1	3.2	59.8 ± 6.4	0.6
BL166	101.7 ± 8.3	1.3	2.6 ± 0.6	0.1
BL221	140.2 ± 11.9	1.2	42.4 ± 12.2	0.4
BL278	96.1 ± 12.4	1.4	30.2 ± 9.0	0.3
BL279	115.6 ± 0.4	1.2	12.6 ± 0.2	0.1
BL280	211.8 ± 5.5	2.5	32.0 ± 3.1	0.5
LPP+	260.3 ± 21.2	2.6	438.8 ± 19.0	5.6

Tabla 5. Captación de arsénico inorgánico (1 mg/L) por cepas de bacterias lácticas. Retención celular de arsénico tras exposición de las cepas bacterias lácticas (10 DO) a As(III) y As(V) (1 mg/L, 10 mL) en PBS durante 4 h. Valores expresados como ng arsénico (media ± SD, n=3) y en porcentaje de retención respecto a la adición de As(III) o As(V).

Cepa	As(III)		As(V)	
	Cantidad (ng)	%	Cantidad (ng)	%
2	17.8 ± 0.9	1.3	9.3 ± 2.3	0.6
3	15.5 ± 2.1	1.1	7.9 ± 0.3	0.6
4	21.3 ± 0.4	0.4	16.3 ± 1.0	0.3
7	20.1 ± 3.1	0.4	7.8 ± 3.0	0.1
8	96.6 ± 4.1	1.9	27.0 ± 2.5	0.4
9	246.3 ± 29.0	5.0	18.9 ± 2.1	0.3
10	142.8 ± 1.7	2.9	10.8 ± 1.0	0.2

Tabla 6. Captación de arsénico inorgánico (1 mg/L) por cepas de *S. cerevisiae*. Retención celular de arsénico tras exposición de las cepas de levaduras (4 DO) a As(III) y As(V) (1 mg/L, 5 mL) en PBS durante 4 h. Valores expresados como ng arsénico (media ± SD, n=3) y en porcentaje de retención respecto a la adición de As(III) o As(V).

4.2. Factores que afectan a la captación de arsénico inorgánico

4.2.1. Concentración de las especies arsenicales

Algunos estudios sobre captación de metales por bacterias o levaduras indican que a medida que aumenta la concentración se reduce la captación del elemento (Chiocchetti *et al.*, 2018). Para determinar si ésta es la razón de la baja acumulación observada en el apartado 1 se ha trabajado a una concentración más baja de las formas arsenicales. Las tablas 7 y 8 muestran la retención celular de las cepas de bacterias lácticas y *S. cerevisiae* respectivamente tras exposición a las formas arsenicales a la concentración de 0.1 mg/L. Se observa para ambos tipos de microorganismos un aumento del porcentaje de retención respecto a los obtenidos a la concentración de 1 mg/L; sin embargo, no se trata de retenciones relevantes (bacterias lácticas: 2-12%; levaduras: 1-6%). Estos datos indican que la baja retención observada a la concentración más alta no se debe a un proceso de saturación, ya que también se evidencia una baja acumulación a la concentración más baja.

Bacteria	As(III)		As(V)	
	Cantidad (ng)	%	Cantidad (ng)	%
BL-17	14.0 ± 1.3	4.7	7.5 ± 0.2	1.9
BL-36	21.4 ± 2.1	7.1	19.4 ± 2.7	5.4
LPP ⁺	33.9 ± 2.3	11.5	12.8 ± 1.5	4.4
BL-75	9.1 ± 1.7	3.1	7.7 ± 0.6	2.2

Tabla 7. Captación de arsénico inorgánico (0.1 mg/L) por bacterias lácticas. Retención celular de arsénico tras exposición de las bacterias lácticas (10 DO) a As(III) y As(V) (0.1 mg/L, 5 mL) en PBS durante 4 h. Valores expresados como ng arsénico (media ± SD, n=3) y en porcentaje de retención respecto a la adición de As(III) o As(V).

Cepa	As(III)		As(V)	
	Cantidad (ng)	%	Cantidad (ng)	%
2	27.3 ± 0.9	5.5	22.6 ± 0.1	4.5
3	9.3 ± 0.1	1.9	17.7 ± 3.2	3.6
8	23.4 ± 1.7	4.9	6.6 ± 1.1	1.1
9	27.8 ± 3.2	5.8	7.4 ± 1.1	1.2
10	16.0 ± 5.2	3.3	6.2 ± 1.3	1.0

Tabla 8. Captación de arsénico inorgánico (0.1 mg/L) por cepas de levaduras. Retención celular de arsénico tras exposición de las cepas de levaduras (4 DO) a As(III) y As(V) (0.1 mg/L, 5 mL) en PBS durante 4 h. Valores expresados como ng arsénico (media ± SD, n=3) y en porcentaje de retención respecto a la adición de As(III) o As(V).

4.2.2. Viabilidad de los microorganismos

Los resultados presentados hasta el momento muestran que existe una baja captación independientemente de la concentración. Debido al carácter aniónico de las formas arsenicales, posiblemente la interacción a superficie sea minoritaria debido a que las superficies celulares de ambos microorganismos presentan mayoritariamente cargas negativas. Para evaluar si la

interacción es superficial o requiere de alguna forma de transporte se ha evaluado la captación de las bacterias y levaduras tras ser sometidas a un tratamiento térmico que reduce de forma importante su viabilidad. La tabla 9 muestra la captación de los microorganismos tratados y no tratados térmicamente.

Condiciones	As(III)		As(V)	
	Cantidad (ng)	%	Cantidad (ng)	%
LPP⁺ (bacteria)				
Vivas	209.4 ± 4.2	3.8	226.3 ± 9.4	5.1
Muertas	149.5 ± 82.5	2.7	171.3 ± 10.2	3.9
Cepa 10 (levadura)				
Vivas	46.8 ± 5.5	1.0	37.7 ± 2.3	0.8
Muertas	6.1 ± 0.4	0.1	6.3 ± 2.8	0.1

Tabla 9. Efecto de la viabilidad de la cepa en la captación de arsénico inorgánico. Captación de As(III) y As(V) (1 mg/L, 5 mL) tras exposición durante 4 h de la cepa bacteriana LPP⁺ (10 DO) y la cepa 10 de levadura (4 DO) con o sin tratamiento térmico previo. Valores expresados como media ± SD (n=3).

Los datos muestran que en cualquiera de las condiciones la captación es muy baja, pero que la viabilidad de las células favorece la acumulación celular. Este hecho que indica que la escasa captación que existe se debe en parte a un mecanismo que depende del metabolismo, posiblemente algún tipo de transporte sujeto a un transportador de membrana.

4.2.3. Medio de incubación

Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que la captación de arsénico inorgánico se debe en parte a una internalización, posiblemente empleando algún tipo de transportador. Estudios en otros sistemas celulares han evidenciado que parte del transporte de As(V) tiene lugar a través de los transportadores de fosfato debido a la similitud estructural de ambos oxoaniones (Villa Bellosta y Sorribas, 2008; Calatayud *et al.*, 2012). Para el As(III) se han descrito otro tipo de transportadores, algunas permeases de glucosa (GLUT), aquaporinas y transportadores de aniones orgánicos (Liu *et al.*, 2002, 2006; Calatayud *et al.*, 2012). Por tanto, el transporte de arsénico inorgánico puede verse afectado por la presencia de los sustratos de estos transportadores debido a fenómenos de competencia o por la reducción del metabolismo celular. Para evaluar la influencia del medio de incubación en la captación del metaloide por parte de bacterias lácticas y levaduras, se han llevado a cabo incubaciones con diferentes medios y se han obtenido los resultados que se presentan en las figuras 3 (bacterias lácticas) y 4 (*S. cerevisiae*).

La incubación con medio salino sin fosfato (NaCl 0.9%) incrementa la captación de As(V) en ambas cepas con respecto a los datos obtenidos con PBS (apartado 4.1); sin embargo, no tiene efecto sobre la acumulación de As(III). La adición de fosfato inorgánico al medio salino a la misma concentración a la que se encuentra en el PBS (NaCl 0.9% + 10 mM de fosfato inorgánico) reduce significativamente la cantidad de As(V) acumulado por bacterias y levaduras y no afecta la acumulación de As(III). La presencia de glucosa en el medio sólo modifica la entrada de As(V) en levaduras, aumentando significativamente la cantidad retenida de esta especie (7-10%). La inhibición de la acumulación de As(V) en presencia de fosfato sugiere una competencia entre ambos elementos, debido posiblemente al empleo de un transportador común, tal y como se muestra en otros organismos. El hecho de que la glucosa incremente el transporte de As(V) en levaduras puede deberse a que el transporte al interior celular sea dependiente de energía.

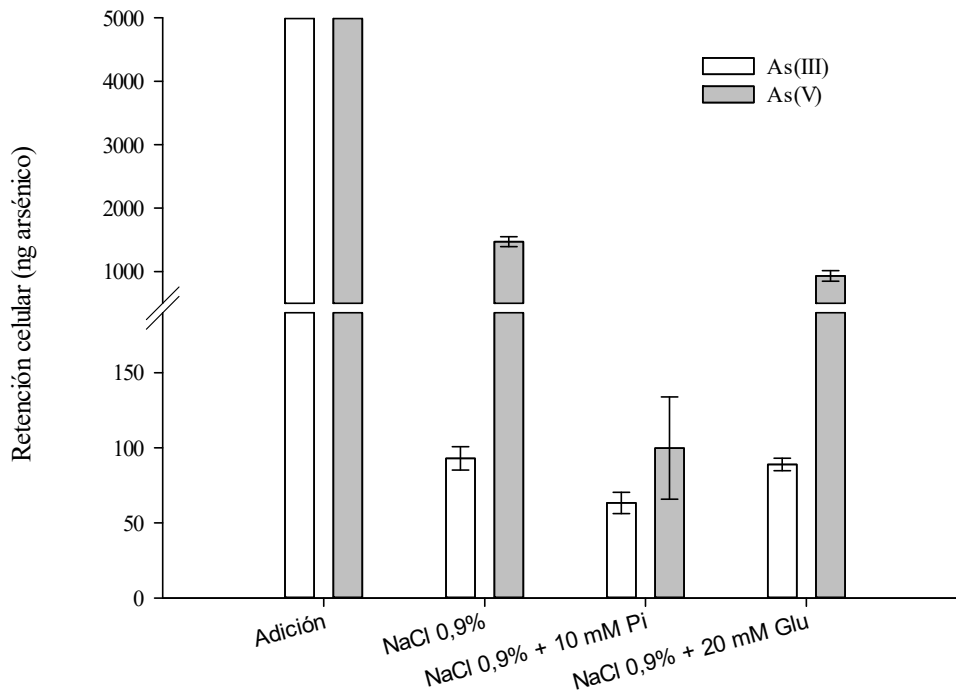


Figura 3. Efecto del medio de incubación sobre la captación de arsénico inorgánico por bacterias lácticas. Retención celular de arsénico tras exposición de la cepa bacteriana LPP⁺ (10 DO) a As(III) y As(V) (1 mg/L, 5 mL) en diferentes medios de incubación durante 4 h. Valores expresados como ng arsénico (media ± SD, n=3).

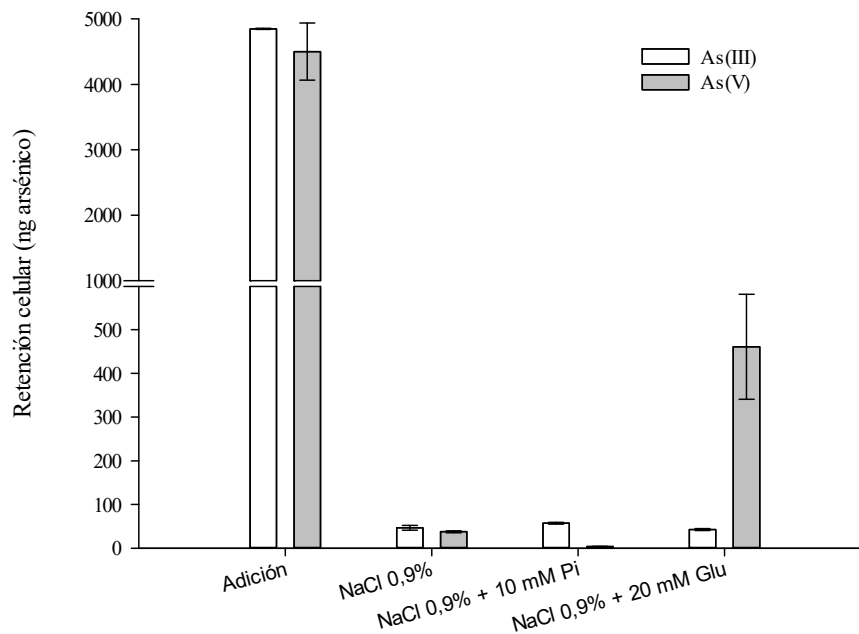


Figura 4. Efecto del medio de incubación sobre la captación de arsénico inorgánico por *Saccharomyces cerevisiae*. Retención celular de arsénico tras exposición de la cepa 10 de *S. cerevisiae* (4 DO) a As(III) y As(V) (1 mg/L, 5 mL) en diferentes medios de incubación durante 4 h. Valores expresados como ng arsénico (media ± SD, n=3).

Adicionalmente se evaluó la concentración de fosfato inorgánico necesaria para producir la reducción de la acumulación celular de As(V) en bacterias y levaduras. La figura 5 muestra la cantidad intracelular de As(V) en ambos microorganismos en ausencia y a concentraciones crecientes de fosfato inorgánico en el medio (0.01-10 mM). Los resultados muestran que a partir de 0.1 mM de fosfato inorgánico, la retención de As(V) empieza a reducirse. En bacterias, se observa una reducción del 27% de la acumulación con 1 mM de fosfato inorgánico y un 88% de reducción en presencia de 10 mM. En *S. cerevisiae*, la reducción es del 28% a la concentración de 0.1 mM de fosfato inorgánico y del 60% para las concentraciones de 1 y 10 mM; sin embargo, incluso en ausencia de fosfato inorgánico los porcentajes de retención en levaduras son bajos. En bacterias lácticas la retención de As(V) a las concentraciones de fosfato habituales en el plasma de adultos (0.9-1.4 mM, Nadaraja, 2011) son elevadas (38-40%).

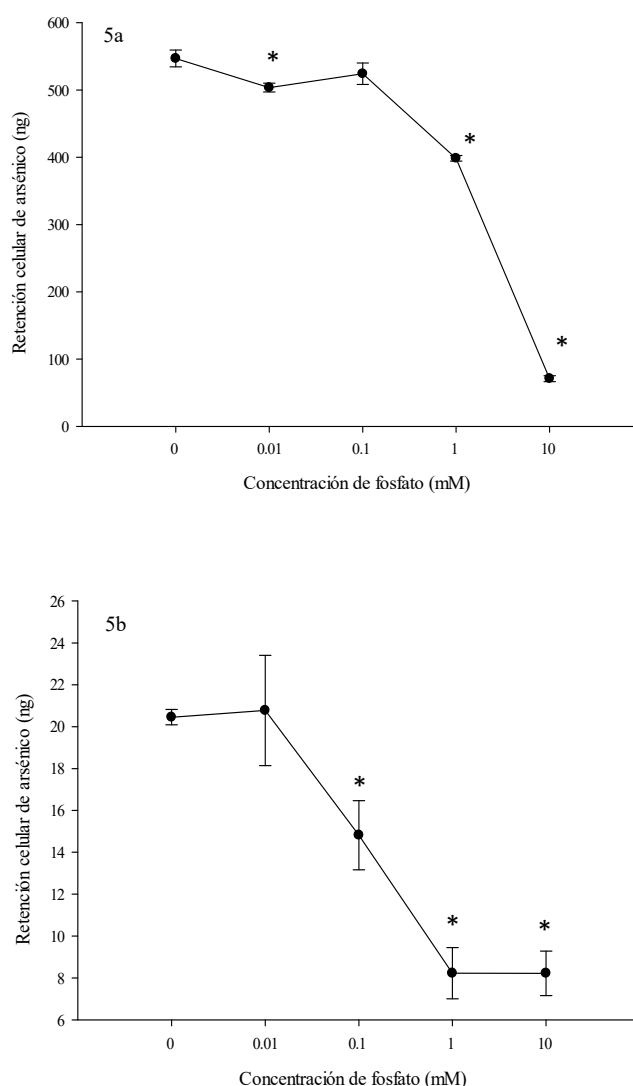


Figura 5. Efecto de la concentración de fosfato inorgánico en el medio sobre la captación de arsénico inorgánico por bacterias lácticas y *Saccharomyces cerevisiae*. Retención celular de arsénico tras exposición de la cepa LPP⁺ (10 DO, figura 5A) y la 10 de *S. cerevisiae* (4 DO, figura 5B) a As(III) y As(V) (1 mg/L, 5 mL) en medio salino (NaCl 0.9%) con diferentes concentraciones de fosfato inorgánico durante 4 h. Valores expresados como ng arsénico (media \pm SD, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a la retención observada en ausencia de fosfato inorgánico ($p < 0.05$).

Los datos muestran que las levaduras no son capaces de captar más de un 10% del arsénico inorgánico adicionado; sin embargo, la cepa bacteriana LPP⁺ puede llegar a captar cantidades relevantes de As(V) a concentraciones de fosfato en el medio ≤ 1 mM (38-40%). Para determinar si estas condiciones también favorecen la captación en otras bacterias lácticas, se han incubado las cepas BL36, LGG y BL10 con As(V), empleando un medio con una concentración de fosfato de 1 mM (figura 6). Los resultados muestran que las captaciones son también importantes para BL36 (25%) y la BL10 (28%), *Lactobacillus plantarum* LGG, sin embargo, no presenta una elevada acumulación celular (9%).

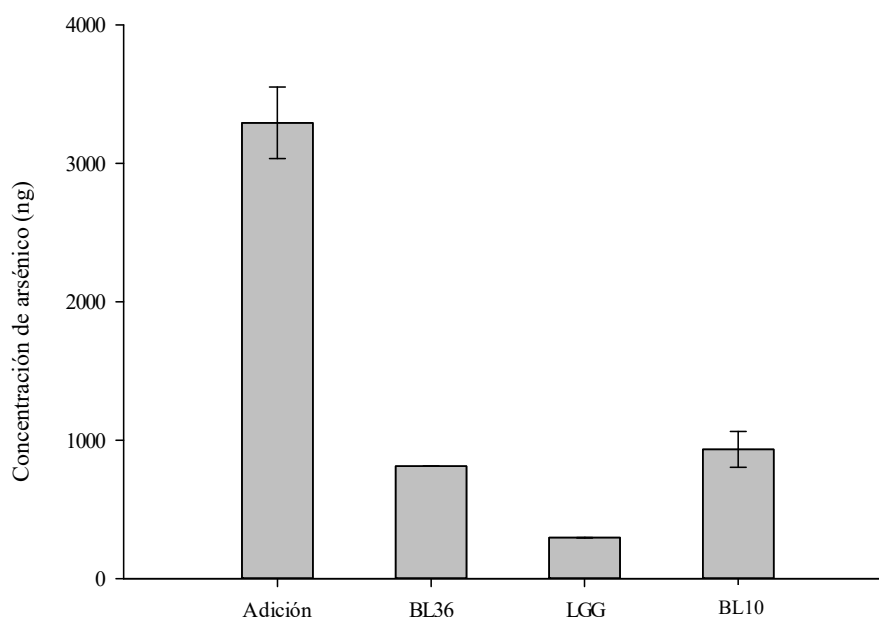


Figura 6. Captación de As(V) por cepas de bacterias lácticas en un medio con fosfato inorgánico 1 mM. Retención celular de arsénico tras exposición de las cepas de bacterias lácticas (10 DO) a As(V) (1 mg/L, 5 mL) en NaCl 0.9% con tampón fosfato sódico 1 mM durante 4 h. Valores expresados como ng arsénico (media \pm SD, n=2-3).

4.3. Efecto de las bacterias lácticas sobre la bioaccesibilidad de arsénico inorgánico

Los datos obtenidos en los ensayos de captación muestran que las levaduras no son capaces de captar arsénico inorgánico de forma significativa en ninguna de las condiciones ensayadas. Este hecho sugiere que estos microorganismos no son buenas estrategias para conseguir la reducción de la cantidad de arsénico que queda disponible tras la digestión (bioaccesibilidad). Sin embargo, las bacterias pueden ser candidatos adecuados cuando en el medio hay As(V), especie mayoritaria en aguas y alimentos, y cuando las concentraciones de fosfato no son muy elevadas. Atendiendo a estos resultados, se planteó evaluar la eficacia de las bacterias lácticas en la reducción de la bioaccesibilidad de arsénico inorgánico.

La acumulación celular en bacterias de As(III) y As(V) (1 mg/L) tras aplicar una digestión gastrointestinal simulada se muestra en la tabla 10. Los datos muestran que la captación no es relevante para ninguna de las cepas ensayadas ($< 9\%$), y que por tanto las bacterias lácticas ensayadas no son adecuadas para su empleo como reductores de la cantidad de arsénico que puede ser absorbida tras su ingesta. La reducción de la captación observada con respecto a los resultados obtenidos cuando se trabaja con un medio con fosfato 1 mM (figura 6) puede ser debido al aporte de fosfato de los diferentes enzimas y sales que se emplean para la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Cepas	As(III)		As(V)	
	Cantidad (ng)	%	Cantidad (ng)	%
BL36	327.2 ± 21.9	7.8	12.9 ± 1.2	0.3
BL10	329.4 ± 29.7	7.9	17.3 ± 1.9	0.5
LPP ⁺	387.9 ± 28.4	9.3	19.7 ± 5.0	0.5

Tabla 10. Captación de arsénico inorgánico por cepas de bacterias lácticas durante la digestión gastrointestinal. Retención celular de arsénico tras la digestión gastrointestinal conjunta de cepas de bacterias lácticas (10 DO) con disoluciones de As(III) y As(V) (1 mg/L, 10 mL). Valores expresados como ng arsénico (media ± SD, n=3) y en porcentaje de retención respecto a la adición de As(III) o As(V).

4.4. Efecto de las bacterias lácticas y *Saccharomyces cerevisiae* sobre la permeabilidad intestinal de arsénico inorgánico

4.4.1. Efecto de las bacterias lácticas sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de As(III) y As(V)

Se realizaron ensayos preliminares para determinar el tipo de exposición más adecuado para conseguir la reducción de la permeabilidad de las especies arsenicales. En este estudio se realizaron dos tipos de tratamiento: una pre-incubación con las bacterias durante 2 h y un posterior tratamiento con As(III) o una co-exposición As(III)/bacteria durante 90 min. La tabla 11 muestra las permeabilidades obtenidas en cada uno de los tratamientos. Los resultados muestran que sólo la pre-incubación favorece la reducción de la permeabilidad y por ese motivo, el resto de ensayos se realizan con este tipo de tratamiento.

	P_{app} ($\times 10^{-5}$ cm/s) Pre-incubación	P_{app} ($\times 10^{-5}$ cm/s) Co-exposición
As(III)	1.28 ± 0.17	1.52 ± 0.55
As(III) + LGG	0.88 ± 0.27	1.91 ± 0.33

Tabla 11. Efecto de las bacterias lácticas sobre el transporte de As(III) en diferentes condiciones de exposición. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de co-cultivos NCM460/HT29MTX pre-incubados con *Lactobacillus plantarum* LGG (DO 0.6) durante 2 h y posteriormente expuestos a As(III) (0.75 mg/L) durante 90 min o co-expuestos durante 90 min a las bacterias y As(III) sin previa incubación. Valores expresados como cm/s (media ± SD; n=4).

Los ensayos con las bacterias lácticas tras la pre-incubación durante 2 h muestran reducciones importantes del transporte a través de la monocapa intestinal (tabla 12). Las reducciones son mayores para As(III) (33-58%) que para As(V) (15-32%). Son destacables las reducciones de permeabilidad de As(III) observadas con las bacterias BL36, LGG y LPP⁺.

	Reducción del P _{app} As(III) (%)	Reducción del P _{app} As(V) (%)
BL17	32.9 ± 5.2*	16.3 ± 2.3*
BL36	43.8 ± 10.0*	32.3 ± 12.1*
LGG	48.1 ± 15.6*	24.8 ± 4.8*
LPP ⁺	57.9 ± 12.2*	15.4 ± 3.7*

Tabla 12. Efecto de las bacterias lácticas sobre el transporte de As(III) y As(V). Reducciones de los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de co-cultivos NCM460/HT29MTX pre-incubados con bacterias (DO 0.6) durante 2 h y posteriormente expuestos a As(III) o As(V) (0.75 mg/L) durante 90 min. Valores expresados como porcentajes de reducción respecto a los ensayos realizados sin pre incubación con bacterias (media ± SD; n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los ensayos sin bacterias (p < 0.05).

4.4.2. Efecto de las cepas de Saccharomyces sobre la permeabilidad de disoluciones acuosas de As(III) y As(V)

La tabla 13 muestra las reducciones del P_{app} en co-cultivos NCM460/HT29-MTX para As(III) y As(V) tras la adición de las cepas de levadura (DO 1). La mayoría de las cepas ensayadas reducen significativamente la permeabilidad celular de ambas formas arsenicales. En este caso ocurre lo contrario que con las bacterias lácticas, las mayores reducciones se observan sobre el transporte de As(V), siendo especialmente destacables las producidas por las cepas 2 y 9.

	Reducción del P _{app} As(III) (%)	Reducción del P _{app} As(V) (%)
Cepa 2	32 ± 2.6*	49 ± 1.1*
Cepa 3	11 ± 2.2*	34 ± 7.0*
Cepa 9	21 ± 3.5*	45 ± 5.6*
Cepa 10	21 ± 4.0*	22 ± 4.1*

Tabla 13. Efecto de las cepas de Saccharomyces sobre el transporte de As(III) y As(V) en co-cultivos NCM-460/HT29-MTX. Reducciones de los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de co-cultivos NCM460/HT29MTX co-expuestos a As(III) o As(V) (0.75 mg/L) y las levaduras (1 DO) durante 90 min. Valores expresados como porcentajes de reducción respecto a los ensayos realizados sin levaduras (media ± SD; n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los ensayos sin levaduras (p < 0.05).

4.4.3. Efecto de las bacterias lácticas y *Saccharomyces* sobre la permeabilidad del arsénico presente en alimentos

La tabla 14 muestra las reducciones del P_{app} del arsénico presente en las fracciones bioaccesibles de muestras de arroz tras exponer los co-cultivos NCM460/HT29-MTX en presencia de las cepas de bacterias y levaduras seleccionadas de los ensayos en patrones (apartados 4.4.1 y 4.4.2). Los datos evidencian una reducción significativa de la permeabilidad del arsénico en arroz para la cepa bacteriana LPP⁺ (45%) y para todas las cepas de levaduras ensayadas (19-27%).

	P_{app} ($\times 10^{-5}$ cm/s)	Reducción del P_{app} (%)
Bacterias lácticas		
Sin bacterias	1.12 \pm 0.25	
LGG	1.29 \pm 0.05	No hay reducción
LPP ⁺	0.62 \pm 0.15	44.6 \pm 13*
BL36	0.91 \pm 0.08	18.7 \pm 7.1
Levaduras		
Sin levaduras	1.42 \pm 0.03	
Cepa 2	1.14 \pm 0.04	19 \pm 3.4*
Cepa 3	1.04 \pm 0.07	27 \pm 5.0*
Cepa 9	1.15 \pm 0.08	19 \pm 5.4*

Tabla 14. Efecto de las cepas de bacterias lácticas y levaduras sobre el transporte de arsénico desde arroz. Coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de co-cultivos NCM460/HT29-MTX expuestos durante 75 min a las fracciones bioaccesibles en presencia o ausencia de las cepas de bacterias lácticas y levaduras y reducción del P_{app} en presencia de estas cepas (media \pm SD; n=6). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en los valores de P_{app} con respecto a los ensayos de permeabilidad realizados sin microorganismos ($p < 0.05$).

5. DISCUSIÓN

El empleo de microorganismos por su capacidad de captar elementos traza tóxicos se ha extendido en los últimos años. Su uso como estrategia de bioremediación ha dado resultados satisfactorios. La concentración de elementos como arsénico, cadmio, cromo, cobre, mercurio, níquel y plomo, se ha reducido de forma considerable en suelos y aguas contaminadas tras aplicar métodos convencionales coadyuvados por microorganismos normalmente inmovilizados sobre diferentes tipos de materiales o mediante el empleo de bacterias y levaduras sin otro tratamiento complementario (Dixit *et al.*, 2015; de Alencar *et al.*, 2017, Niloofar *et al.*, 2017).

La bioremediación puede ser el resultado de varios mecanismos de captación y/o resistencia de los microorganismos, entre los que hay que destacar los fenómenos de adsorción a superficie y absorción. La superficie de las bacterias lácticas está compuesta por una capa gruesa de peptidoglucanos, ácidos (lipo)teicoicos, proteínas y polisacáridos. Algunas cepas también pueden producir exopolisacáridos. Estas estructuras contienen varios grupos con carga negativa que pueden favorecer la unión a superficie de cationes metálicos. Teemu *et al.* (2008) ponen de manifiesto que la unión de cadmio y plomo a *Lactobacillus fermentum* ME3 y *Bifidobacterium*

longum 46 se reduce cuando las cargas negativas de los grupos carboxilo y fosforilo se neutralizan químicamente, hecho que evidencia la participación de estos grupos funcionales en la adsorción de ambos metales. El papel de los grupos carboxilo de las proteínas de la capa S de *Lactobacillus kefir* también se ha evidenciado importante para la captación de metales como el cadmio, zinc, plomo y níquel (Gerbino *et al.*, 2011).

La pared celular de la levadura también se compone de varias capas que contienen grupos aniónicos. La capa interna, que consiste en β -D-glucanos [β (1,3)- y β (1,6)-D-glucanos] y quitina, representa 50-60% del peso seco de la pared. La capa externa está formada por manoproteínas fuertemente glicosiladas. Se ha identificado el papel de los fosfomananos y los grupos carboxilo de las proteínas de la pared celular de la levadura *S. cerevisiae* en la unión de cationes metálicos (Seki *et al.*, 2005). Este tipo de interacción superficial facilita la captación de cationes metálicos; sin embargo, no facilita la adsorción de metales o metaloides aniónicos como es el caso del arsénico inorgánico. Esto se evidencia en los resultados obtenidos en el presente estudio con el arsénico inorgánico, donde las captaciones no son elevadas y donde se observa una disminución importante cuando se trabaja con microorganismos no viables, hechos todos ellos que apuntan a una interacción de otro tipo.

La absorción de elementos traza tóxicos también se ha descrito en bacterias y levaduras. Gomes *et al.* (2002) muestran que Zrt1, un transportador responsable de la absorción de zinc en levaduras, media la absorción de cadmio en *S. cerevisiae*. Shen *et al.* (2012) ponen de manifiesto que la sobreexpresión del transportador de fosfato Pho84 en cepas de *Saccharomyces* aumenta un 50% el transporte de As(V). Shah *et al.* (2010) también muestran que las células de *S. cerevisiae* que sobreexpresan la aquagliceroporina Fps1p eliminan un 40% más de As(III) del medio extracelular. También se han identificado transportadores de arsénico inorgánico en bacterias. En *Escherichia coli*, el arsénico inorgánico pentavalente se internaliza mediante dos transportadores de fosfato, PST y Pit. PST es un sistema de alta afinidad y baja capacidad inducido por situaciones de deficiencia en fosfato, mientras que el Pit es un sistema constitutivo de baja afinidad y alta capacidad (Yang *et al.*, 2012). En el presente estudio se evidencia que el transporte de As(V) se ve afectado por la presencia de fosfato en el medio, especialmente en *Lactobacillus*. Este hecho sugiere que el As(V) se acumula en las bacterias lácticas evaluadas gracias a la participación del transportador de fosfato, tal y como indican los trabajos previamente citados. Esta competencia reduce las posibilidades de emplear las bacterias lácticas y las levaduras del género *Saccharomyces* para intentar reducir la cantidad de arsénico que queda soluble tras la digestión (bioaccesibilidad), ya que en el lumen intestinal existen contenidos elevados de fosfato y por tanto, se reducen las posibilidades de captación de arsénico inorgánico por parte de estos microorganismos.

Teniendo en cuenta que la posibilidad de reducir la exposición a arsénico inorgánico disminuyendo la cantidad de arsénico inorgánico disponible para la absorción (bioaccesibilidad) es baja, se ha estudiado la posibilidad de reducir esta exposición modificando la absorción intestinal del tóxico, es decir, su paso a través de la pared intestinal. Los estudios de transporte realizados empleando ambos tipos de microorganismos muestran reducciones importantes con la cepa bacteriana LPP⁺ y algunas cepas de *S. cerevisiae*. Estas reducciones se producen cuando el arsénico inorgánico está en disolución acuosa y cuando éste forma parte de un alimento, por tanto, este tipo de estrategia puede ser útil para ambos tipos de situaciones. La reducción de la absorción puede ser consecuencia de la formación de un complejo arsénico/microorganismo que no se absorba o bien a una modulación de la permeabilidad de la monocapa celular por parte de los microorganismos que reduzca el transporte. Este estudio ha evidenciado que el arsénico no interacciona con las bacterias y levaduras ensayadas, por tanto, la reducción del transporte tiene que ser consecuencia del efecto de estos microorganismos sobre las células intestinales.

La modulación de la permeabilidad de las monocapas intestinales está en gran medida gobernada por las proteínas que conforman las uniones intercelulares (Anderson y Van Itallie, 2009). Se ha evidenciado que determinados patógenos, xenobióticos y citoquinas pro-

inflamatorias pueden incrementar el espacio intercelular al reducir la expresión de las proteínas de las uniones, lo que conlleva aumentos de la permeabilidad y la pérdida de la función barrera. Por el contrario, otros elementos favorecen el mantenimiento de la función barrera y la permeabilidad intestinal. Se ha puesto de manifiesto que las bacterias lácticas pueden aumentar la expresión de las proteínas de las uniones y mantener la función barrera en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Ulluwishewa *et al.*, 2011). También se ha puesto de manifiesto que algunas cepas de *S. cerevisiae*, especialmente la variedad *boulardii* (cepa 7 de nuestro estudio), favorecen la restauración de las uniones estrechas y la permeabilidad de la barrera intestinal tras infecciones bacterianas (Moslehi-Jenabian *et al.*, 2010). Esta modulación supone una reducción del paso paracelular que tiene lugar entre células. Este hecho podría conllevar disminuciones importantes del paso de arsénico inorgánico a través de la monocapa intestinal. Estudios previos han evidenciado que el transporte de las formas arsenicales inorgánicas tiene un componente paracelular que es mayoritario (Calatayud *et al.*, 2010, 2011).

6. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente estudio permiten concluir que:

- Las levaduras del género *Saccharomyces* ensayadas no tienen capacidad para adsorber/captar las formas arsenicales inorgánicas
- Las cepas de *Lactobacilos* sólo captan cantidades relevantes de As(V) cuando las concentraciones de fosfato en el medio son inferiores a 1 mM. Este hecho es posiblemente consecuencia del empleo de los transportadores de fosfato en la incorporación de As(V) por parte de las bacterias.
- La capacidad de unión de As(V) a las bacterias no se mantiene en las condiciones de la digestión gastrointestinal, por tanto, no son capaces de reducir la bioaccesibilidad de arsénico inorgánico. Este hecho puede ser debido a la presencia de fosfato en la digestión procedente de las sales y enzimas empleados en el modelo de digestión *in vitro*.
- Los datos de transporte a través de la monocapa de células intestinales ha evidenciado que ambos tipos de microorganismos pueden reducir la absorción en células intestinales y por tanto ser buenas estrategias para reducir la entrada de arsénico a la circulación sistémica y por ende para reducir la exposición al tóxico.
- Estos efectos podría verse modificado *in vivo* debido a la composición e interacciones existentes en el lumen, más complejas que las emuladas con los modelos *in vitro* aplicados en este trabajo. Por tanto, son necesarios estudios *in vivo* para confirmar lo hallado en el presente estudio y determinar si alguno de estos probióticos puede ser empleado como futura estrategia de intervención en poblaciones de zonas altamente contaminadas.

7. REFERENCIAS

- ANDERSON, J.M.; VAN, ITALLIE, C.M. (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 1: a002584.
- BOGDAN, K.; SCHENK, M. K. (2008). Arsenic in rice (*Oryza sativa* L.) related to dynamics of arsenic and silicic acid in daddy soils. *Environ. Sci. Technol.*, 42: 7885-7890.
- BUCHET, J. P.; LISON, D. (2000). Clues and uncertainties in the risk assessment of arsenic in drinking water. *Food Chem. Toxicol.*, 38: S81-S85.
- BRAMMER, H. (2009). Mitigation of arsenic contamination in irrigated paddy soils in south and south-east Asia. *Environ. Int.*, 35: 856-863.
- BUNDSCHUH, J.; LITTER, M.I.; PARVEZ, F.; ROMÁN-ROSS, G.; NICOLLI, H.B.; JEAN, J.S.; LIU, C.W.; LÓPEZ, D.; ARMIENTA, M.A.; GUILHERME, L.R.; CUEVAS, A.G.; CORNEJO, L.; CUMBAL, L.; TOUJAGUEZ, R. (2012). One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *Sci. Total Environ.*, 429: 2-35.
- CALATAYUD, M.; GIMENO, J.; VÉLEZ, D.; DEVESA, V.; MONTORO, R. (2010). Characterization of the intestinal absorption of arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid using the Caco-2 cell line. *Chem. Res. Toxicol.*, 23: 547-556.
- CALATAYUD, M.; DEVESA, V.; MONTORO, R.; VÉLEZ, D. (2011). In vitro study of intestinal transport of arsenite, monomethylarsonous acid, and dimethylarsinous acid by Caco-2 cell line. *Toxicol. Lett.*, 204: 127-133.
- CALATAYUD, M.; BARRIOS, J.A.; VÉLEZ, D.; DEVESA, V. (2012). In vitro study of transporters involved in intestinal absorption of inorganic arsenic. *Chem. Res. Toxicol.*, 25: 446-453.
- CHEN, C.J.; CHEN, C.W.; WU, M.M.; KUO, T.L. (1992). Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *Br. J. Cancer.*, 66: 888-892.
- CHIOCCHETTI, G.M.; JADÁN-PIEDRA, C.; MONEDERO, V.; ZÚÑIGA, M.; VÉLEZ, D.; DEVESA, V. (2018). Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1-12.
- CLEMENTE, M.J.; DEVESA, V.; VÉLEZ, D. (2016). Dietary strategies to reduce the bioaccessibility of arsenic from food matrices. *J. Agric. Food Chem.*, 64: 923-931.
- CLEMENTE, M.J.; DEVESA, V.; VÉLEZ, D. (2017). In vitro reduction of arsenic bioavailability using dietary strategies. *J. Agric. Food Chem.*, 65: 3956-3964
- CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. (2007). Review article: yeast as probiotics *Saccharomyces boulardii*. *Alim. Pharm. Therap.*, 26: 767-778.
- DE ALENCAR, F.L.S.; NAVONI, J.A.; DO AMARAL, V.S. (2017) The use of bacterial bioremediation of metals in aquatic environments in the twenty-first century: a systematic review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 24: 16545-16559.
- DIXIT, R.; WASIULLAH; MALAVIYA, D.; PANDIYAN, K.; SINGH, U.B.; SAHU, A.; SHUKLA, R.; SINGH, B.P.; RAI, J.P.; SHARMA, P.K.; LADE, H.; PAUL, D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7: 2189-2212.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009). Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA J.*, 7: 1351.

- FERREIRA, I.M.P.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVARELA, J.G. (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends Food Sci. Technol.*, 21: 77-84.
- GERBINO, E.; MOBILI, P.; TYMCZYSZYN, E.; FAUSTO, R.; GOMEZ-ZAVAGLIA, A. (2011). FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between *L. kefir* S-layers and metal ions. *J. Mol. Struct.*, 987: 186-192.
- GOMES, D.S.; FRAGOSO, L.C.; RIGER, C.J.; PANEK, A.D.; ELEUTHERIO, E.C. (2002). Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1573: 21-25.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (2004). Summaries & evaluations: Arsenic in drinking-water (Group 1). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol. 84, Lyon.
- JADÁN-PIEDRA, C.; ALCÁNTARA, C.; ZÚÑIGA, M.; MONEDERO, V.; VÉLEZ, D.; DEVESA, V. (2017). The use of lactic acid bacteria to reduce mercury bioaccessibility. *Food Chem.*, 228: 158-166.
- JADÁN-PIEDRA, C.; BAQUEDANO, M.; PUIG, S.; VÉLEZ, D.; DEVESA, V. (2017) The Use of *Saccharomyces cerevisiae* to reduce the bioaccessibility of mercury. *J. Agric. Food Chem.*, 65: 2876-2882
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2011). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. In: WHO Food Additives Series No.: 63, prepared by the seventy-second meeting of JEFCA. World Health Organization, Geneva.
- LAPARRA, J.M.; VÉLEZ, D.; MONTORO, R.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R. (2003). Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 6080-6085.
- LIU, Z.; SHEN, J.; CARBREY, J.M.; MUKHOPADHYAY, R.; AGRE, P.; ROSEN, B.P. (2002). Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 6053-6058.
- LIU, Z.; SANCHEZ, M.A.; JIANG, X.; BOLES, E.; LANDFEAR, S.M.; ROSEN, B.P. (2006). Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351: 424-430.
- LJUNGH, A.; WADSTRÖM, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 7: 73-89.
- MCFARLAND, L.V. (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol.*, 16: 2202-2222.
- MONACHESE, M.; BURTON, J. P.; REID, G. (2012). Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 6397-6404.
- MOSLEHI-JENABIAN, S.; PEDERSEN, L.L.; JESPERSEN, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, 2: 449-473.
- NADARAJA, S.P. (2011). Regulation of pathways involved in intestinal phosphate transport. Tesis doctoral en ciencias. Universidad de Londres. 296 pp.
- NILOOFAR, N.; MORTEZA, Z.; SEYYED, A.S. (2017). Immobilization techniques for microbial bioremediation of toxic metals, en: *Handbook of metal-microbe interactions and bioremediation*. Ed. CRC Press, Taylor & Francis group.
- OMS (2012) Arsenic fact sheet., No: 372, Geneva. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/>

- RAHMAN, A.K.; M.A.; DIRK, B.; FRETIN, D.; SAEGERMAN, C.; AHMED, M.V.; MUHAMMAD, N.; HOSSAIN, A.; ABATIH, E. (2012). Seroprevalence and risk factors for brucellosis in a high-risk group of individuals in Bangladesh. *Foodborne Pathog. Dis.*, 9; 190-197.
- SAKURAI, T.; FUJIWARA, K. (2001). Modulation of cell adhesion and viability of cultures murine bone marrow cells by arsenobetaine, a major organic arsenic compound in marine animals. *Br. J. Pharmacol.*, 132: 143-150.
- SAKURAI, T. (2002). Biological effects of organic compounds in seafood. *Appl. Organometal. Chem.*, 16: 401-405.
- SAKURAI, T.; KOJIMA, C.; OCHIAI, M.; OHTA, T.; FUJIWARA, K. (2004). Evaluation of in vivo acute immunotoxicity of a major organic arsenic compound arsenobetaine in seafood. *Int. Immunopharmacol.*, 4: 179-184.
- SEKI, H.; SUZUKI, A.; MARUYAMA, H. (2005). Biosorption of chromium(VI) and arsenic(V) onto methylated yeast biomass. *J. Colloid Interface Sci.*, 281: 261-266.
- SHAH, D.; SHEN, M.W.; CHEN, W.; DA SILVA, N.A. (2010). Enhanced arsenic accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing transporters Fps1p or Hxt7p. *J. Biotechnol.*, 150: 101-107.
- SHEN, M.W.; SHAH, D.; CHEN, W.; DA SILVA, N. (2012). Enhanced arsenate uptake in *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing the Pho84 phosphate transporter. *Biotechnol. Prog.*, 28: 654-661.
- SINGH, A.L.; SARMA, P.N. (2010). Removal of arsenic(III) from waste water using *Lactobacillus acidophilus*. *Bioremediat. J.* 14: 92-97.
- SMITH, A.H.; BIGGS, M.L.; MOORE, L.; HAQUE, R.; STEINMAUS, C.; CHUNG, J.; HERNANDEZ, A.; LOPIPERO, P. (1999). Cancer risks from arsenic in drinking water: implication for drinking water standards, en: *Arsenic exposure and health effects*. Ed. Elsevier Science, 191-199.
- TEEMU, H.; SEPPO, S.; JUSSI, M.; RAIJA, T.; KALLE, L. (2008). Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 125: 170-175.
- VILLA BELLOSTA, R.; SORRIBAS, V. (2008). Role of rat sodium/phosphate cotransporters in the cell membrane transport of arsenate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 232: 125-134.
- WU, Y.; WEN, Y.; ZHOU, J.; DAI, Q.; WU, Y. (2012) The characteristics of waste *Saccharomyces cerevisiae* biosorption of arsenic(III). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 19: 3371-3379.
- YANG, H.C.; FU H.L.; LIN Y.F.; ROSEN B.P. (2012) Pathways of arsenic uptake and efflux. *Curr. Top Membr.*, 69: 325-358.