

Análisis Microscópico de Muestras Comerciales de *Spirulina* (Cyanophyta)

Patricia M. ARENAS * y Alicia R. CORTELLA

L.E.B.A.- Facultad de Ciencias Naturales y Museo,
Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata, Argentina

RESUMEN. Se analizó el contenido de muestras comerciales de *Spirulina* (Cyanophyta), expandidas en el mercado como suplementos dietéticos y adelgazantes. Fueron observadas al microscopio fotónico y al microscopio electrónico de barrido (MEB), previo tratamiento por "freeze drying". Los resultados indican que todas contienen *Spirulina platensis*. En algunas de ellas esta especie se presenta pura, mientras que en otras se halla mezclada con otras Cyanophyta (*Oscillatoria* y *Phormidium*) debido probablemente a contaminación del medio de cultivo.

SUMMARY. "Microscopical Analysis of Comercial Samples of *Spirulina* (Cyanophyta)". Comercial samples labeled "*Spirulina*" (Cyanophyta) used as food suplement were analysed with Photonic Microscop and Scanning Electronic Microscop (using "freeze drying" method). In all of them *Spirulina platensis* was identified. Species of other Cyanophyta, *Oscillatoria* and *Phormidium*, were found together with *Spirulina platensis*, probably as a contamination of culture medium.

INTRODUCCION

Existen referencias en las crónicas de la conquista de México, entre los siglos XVI y XVIII, acerca del uso de *Spirulina*, alga verdeazulada. En ellas se alude al consumo que hacían de esta alga los habitantes de los alrededores del lago Texcoco (América Central), a lo que llamaban *Tecutlatl*. Se comía con maíz y otros granos nativos, en una compota llamada *Chimolli*. Según los relatos, extraían del agua una especie de limo o cieno (Cyanophyta) que dejaban secar al sol sobre la arena, y con ello luego hacían panes. Estos poseían gusto a queso y eran ligeramente salados ¹. Por otro lado, en el lago Tchad, Africa Central, los miembros de la tribu "Kanembous" ² consumen un preparado en base a *Spirulina*, denominado *Dthé*, el que preparan agregándole tomate y varias especias ³.

PALABRAS CLAVE: *Spirulina*, Suplemento dietético, Taxonomía.

KEY WORDS: Food suplement, *Spirulina*, Taxonomy.

* Autor a quien dirigir la correspondencia.

El desmesurado crecimiento de la población humana ha llevado a examinar fuentes alimenticias poco convencionales como recurso potencial. El alto contenido en proteínas de *Spirulina* (60 a 70 % de peso seco) le confiere un elevado valor nutritivo, aunque de bajo poder calórico. Según datos oficiales de la FAO y de la OMS, aún en los países desarrollados la alimentación es desequilibrada, en exceso o en defecto, lo que trae aparejado trastornos cardio-vasculares, arterioesclerosis, hipertensión, etc. ⁴.

Actualmente en Occidente se emplean estas algas con otros objetivos, tales como reducir el apetito en obesos ⁵. Por tal razón se expende comercialmente como suplemento dietético, ya que posee β -caroteno, vitaminas C, E, y algunas del grupo B, fundamentalmente B6 y B12, además de todos los aminoácidos esenciales y no esenciales ⁶.

La presencia de vitaminas liposolubles e hidrosolubles aisladas de *Spirulina* justificarían su uso como complemento alimenticio.

Por otra parte, se han aislado de *Spirulina* distintos metabolitos con acción farmacológica para diferentes patologías: *ácido gammalinolénico*, utilizado como droga antihipercolesterolemica, como protector de enfermedades cardio-vasculares ⁵ y del que recientemente se ha descubierto sus efectos benéficos en neuropatías diabéticas ⁷; *ácido araquidónico*, precursor en la biosíntesis de tromboxanos, leucotrienos y prostaglandinas, al que se lo utiliza combinado con ácido linoleico y linolénico cuando hay deficiencia en grasas relacionado con la vitamina F; *fenilalanina*, aminoácido esencial para la dieta, que se ha usado para tratar la depresión⁸.

El objetivo del presente trabajo es analizar el contenido de muestras comerciales de *Spirulina*, utilizadas como suplemento dietético y adelgazante natural, determinando las especies presentes en cada una de ellas.

MATERIAL Y METODOS

Características generales de spirulina

Es un alga cosmopolita, que vive fundamentalmente en aguas estancadas y sulfurosas ⁹⁻¹¹. Se desarrolla en ambientes con elevada concentración salina (2 a 270 g de sal por litro de agua), bicarbonatadas, con pH elevado (superior a 9) y temperaturas templadas (25 a 35 °C), con buena disponibilidad de luz ¹².

El material estudiado corresponde a muestras obtenidas de productos comerciales, utilizados como suplemento dietético.

Muestra A (origen: USA); presentación: comprimidos; etiqueta: "500 mg de *Spirulina* por comprimido, en una base natural de celulosa microcristalina, celulosa, sílice, ácido esteárico vegetal". La información adicional se refiere a su "contenido en ácido gammalinolénico, linoleico y araquidónico, alto contenido en hierro, ácido desoxi- y ribonucleico, clorofila y pigmento azul. Beneficiosa cuando se adelgaza. Ayuda al sistema inmunológico, reduce el colesterol y facilita la absorción de minerales".

Muestra B (origen: USA); presentación: comprimidos; etiqueta: "Puro plancton vegetal. Cada tableta contiene microalga planctónica *Spirulina*. Una de las fuentes más completas de proteínas sin procesar". La propaganda hace alusión a que posee "18 de los 22 aminoácidos conocidos, vitamina B12 y alto nivel de vita-

minas A, B2, B6, D, E, H y K, y todos los minerales esenciales, oligoelementos y enzimas". Asimismo, alude a la presencia de fenilalanina, RNA y DNA.

Es importante resaltar que ésta muestra no menciona su contenido en excipientes.

Muestra C (origen: Chile); presentación: cápsulas; etiqueta: "suplemento dietario conteniendo 300 mg de *Spirulina pura* cada una de ellas, microalga de agua dulce altamente proteica (70 %), rica en aminoácido fenilalanina". La información que se brinda para su comercialización hace referencia a sus cualidades y a sus principales componentes. Esta se refiere a que "se usa con excelentes resultados para dietas de adelgazamiento, ya que algunos aminoácidos, en especial la fenilalanina, estimula la liberación de hormonas gastrointestinales que reducen el apetito. Aporta además betacaroteno y vitaminas E y B12".

Muestra D (origen: Argentina); presentación: cápsulas; etiqueta: "suplemento dietario, 60 cápsulas de 300 mg cada una. Es beneficiosa cuando se desea adelgazar pues reduce el apetito y suple los alimentos necesarios para la salud. Ayuda al sistema inmunológico, reduce el colesterol y facilita la absorción de minerales. V. E.: 1,2 kcal/cápsula. Suplemento dietario de ácido gamalinolénico, hierro, aminoácidos, ácido ribo y desoxirribonucleico (RNA y DNA)".

A los efectos de su análisis posterior, las muestras recibieron el siguiente tratamiento:

- 1) Lavados con agua destilada y centrifugados a 1200 rpm, durante 15 minutos, retirando el líquido sobrenadante y repitiendo la operación varias veces. De ésta manera se logró eliminar los excipientes de los comprimidos.
- 2) Lavados con alcohol. Fue agregado en concentraciones crecientes hasta llegar a alcohol 96 °C.
- 3) Lavados con acetona.
- 4) El material considerado testigo solamente fue suspendido en agua destilada.
- 5) De las muestras tratadas como se describe en el punto (2) se tomaron alícuotas correspondientes a las cápsulas y a los comprimidos, las que se montaron sobre un portaespecímenes de cobre. Este fue colocado en una cápsula de sublimación, la que se mantuvo refrigerada mediante un baño de nieve carbónica y posteriormente colocada dentro del desecador. Por último, se hizo vacío con bomba, con una capacidad de desplazamiento de unos 100 litros por minuto. Esta técnica se denomina "freeze drying" o secado por sublimación¹³ y está basada en los principios de la liofilización.

Las muestras así tratadas fueron observadas, en principio, con microscopio fotónico (FOT) Microlux MX-T, provisto de equipo de contraste de fase y luz polarizada. Se efectuaron dibujos con cámara clara y se obtuvo el correspondiente registro fotográfico. En segundo término, el material se observó al microscópico electrónico de barrido (MEB) Jeol T 100, por lo que se montaron tacos con muestras lavadas con agua, alcohol, acetona y tratadas con el método "freeze drying".

Para el ordenamiento taxonómico de los diferentes taxa se siguió la clasificación propuesta por Bourrelly¹⁴.

RESULTADOS

Las observaciones realizadas con FOT permitieron confirmar la presencia de *Spirulina* en todas las muestras, la que fue determinada taxonómicamente como

Spirulina platensis (Nordst.) Geitler (Figuras 1.1 y 2.2 a 2.5). Las observaciones realizadas con MEB corroboraron los caracteres diagnósticos observados con FOT, propios de *Spirulina*: dimensiones de la célula (largo y ancho) y del tricoma (distancia entre espiras y ancho de la espira).

Tanto en la muestra **A** como en la **B**, esta especie se encontró pura, con los excipientes propios de la elaboración del producto, aún cuando éstos no se mencionan para la muestra **B**.

Por el contrario, en la muestra **C** se halló a *Spirulina platensis* mezclada con diferentes especies de *Oscillatoria* (*Oscillatoria annae* van Goor, *O. irrigua* Kützing, *O. nigra* Vaucher) así como con *Phormidium subfuscum* Kützing, los que se hallaron en aproximadamente las mismas proporciones que la especie en cuestión (Figura 2.1).

En la muestra **D**, también se halló *Spirulina platensis* mezclada con *Oscillatoria sp.*, salvo que en éste caso la proporción de ésta última fue menor que en la muestra **C**.

En la Tabla 1 se pueden apreciar las diferencias morfológicas entre los diferentes géneros hallados.

	género <i>Spirulina</i>	género <i>Oscillatoria</i>	género <i>Phormidium</i>
<i>Características del tricoma</i>	homocistino espiralado isopolar	homocistino recto isopolar	homocistino recto o levemente ondulado heteropolar
<i>Forma de las células</i>	cuadradas a cilíndricas	cilíndricas, discoideas o cuadradas	cilíndricas a discoideas
<i>Célula terminal</i>	redondeada sin caliptra	redondeada con y sin caliptra	capitada
<i>Vaina</i>	ausente	generalmente ausente	facultativa
<i>Movimiento</i>	rotación o arrastre	ondulación	ondulación o arrastre
<i>Tabiques celulares</i>	a veces visibles	generalmente visibles	visibles

Tabla 1. Caracterización morfológica de los diferentes géneros hallados.

Durante las observaciones realizadas al MEB, en casi todos los casos las cápsulas pudieron observarse con mayor nitidez que los comprimidos, ya que éstos comprimidos contienen excipientes que enmascararon, en algunas ocasiones, la morfología de los organismos. No obstante ello, los lavados efectuados con alcohol y acetona mejoraron sensiblemente la observación del material.

Los mejores resultados en cuanto a la observación, se obtuvieron con el material tratado con "freeze-drying".

Descripciones de las especies

Desde el punto de vista taxonómico, las especies de algas verdeazuladas mencionadas en el presente trabajo pertenecen a la División *Cyanophyta*, Subclase *Hormogonophycidae*, Orden *Nostocales*, Familia *Oscillatoriaceae*.

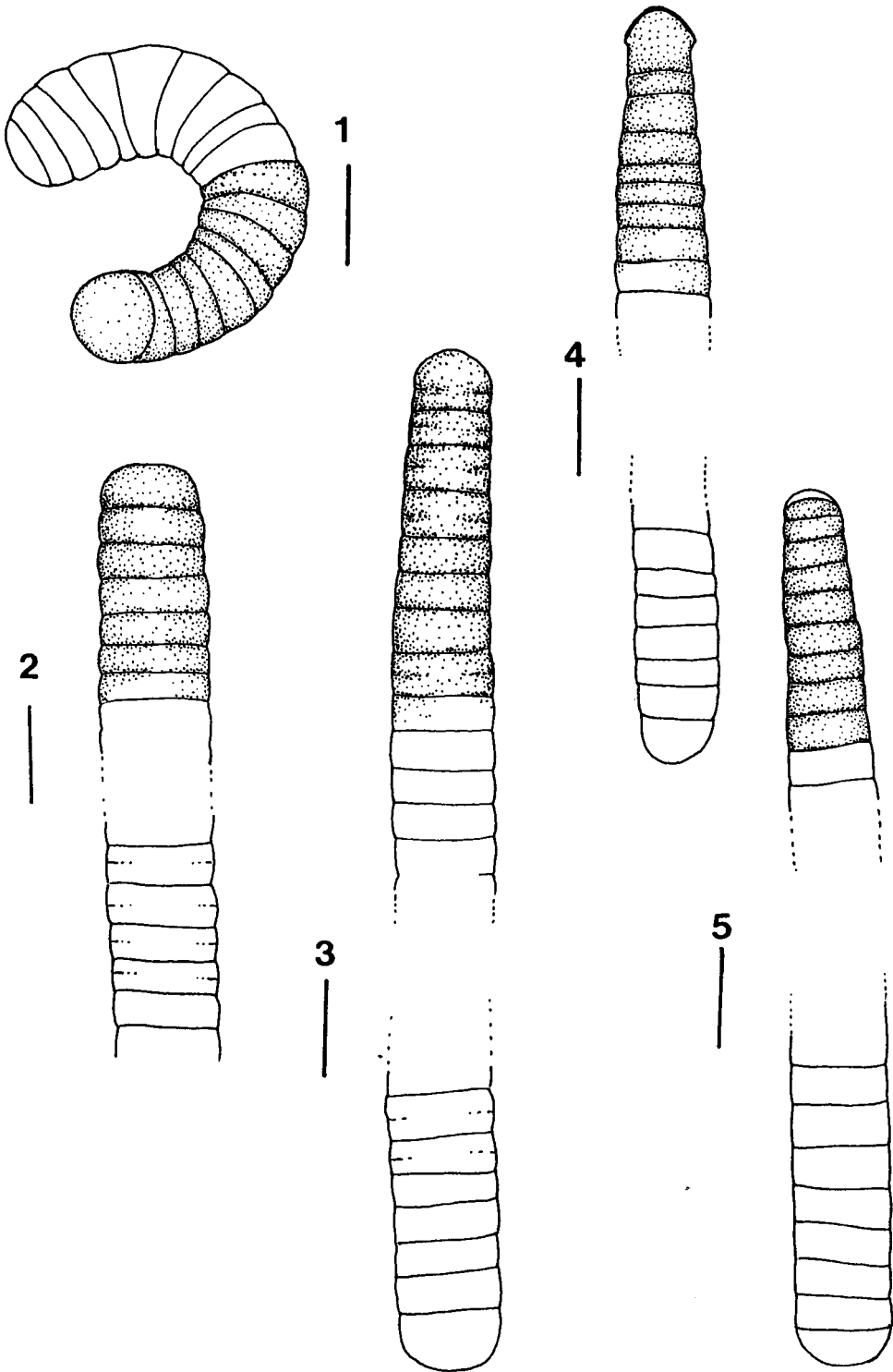


Figura 1. 1) *Spirulina platensis*. 2) *Oscillatoria annae*. 3) *Oscillatoria nigra*. 4) *Phormidium subfuscum*. 5) *Oscillatoria irrigua*. La escala gráfica correspondiente a cada figura equivale a 10 μ m.

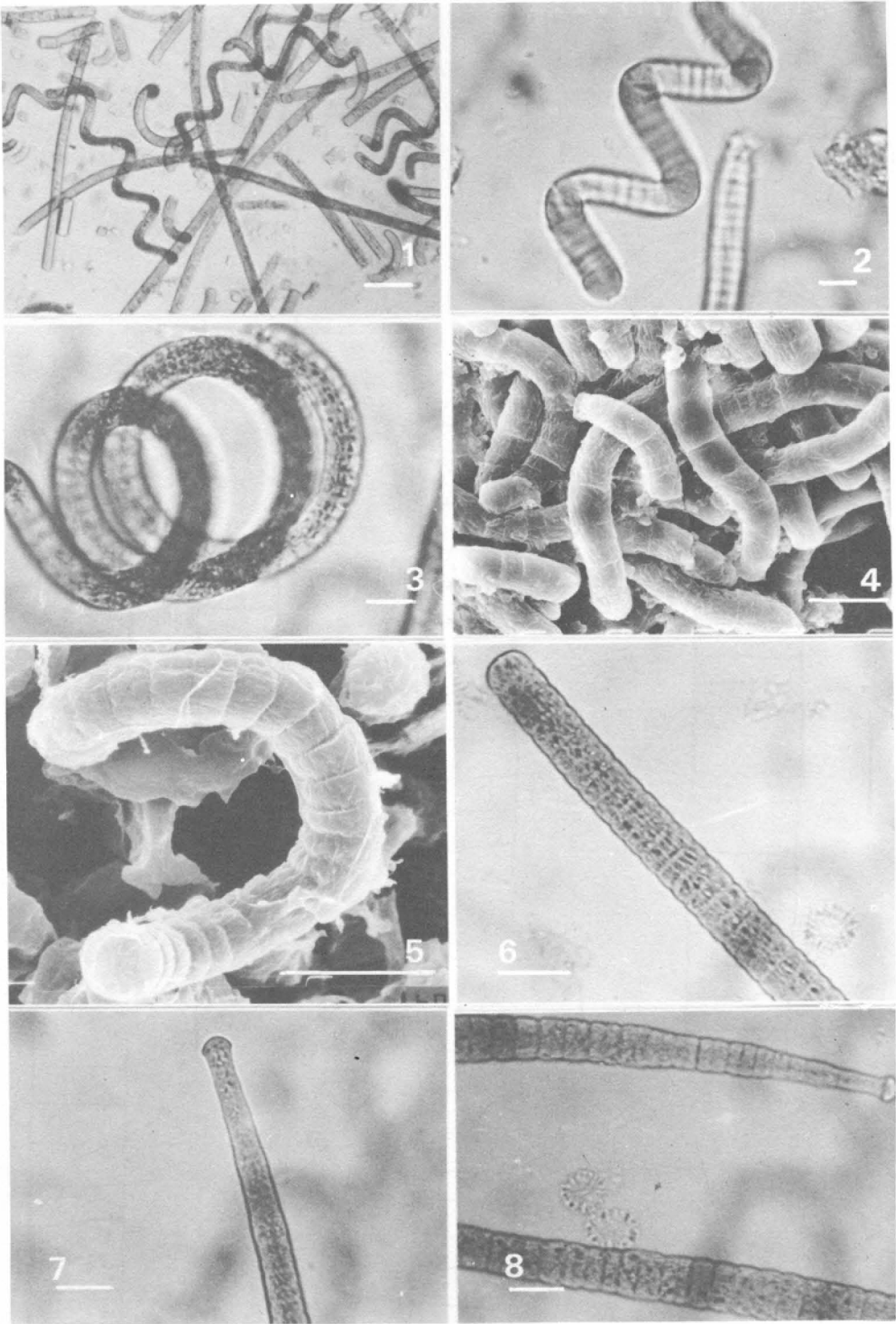


Figura 2. 1) Aspecto general de la muestra C (FOT, 100X). 2) y 3) *Spirulina platensis*. Variabilidad morfológica (FOT, 400X). 4) *Spirulina platensis* (MEB, 2000X). 5) *Spirulina platensis* (MEB, 3500X). 6) *Oscillatoria annae* (FOT, 400X). 7) y 8) *Phormidium subfuscum* (FOT, 400X). La escala gráfica correspondiente a cada figura equivale a 10 μ m; la Figura 2.1 equivale a 40 μ m.

A continuación se ofrece una breve descripción de los caracteres morfológicos que permiten su identificación.

Género *Spirulina*

Spirulina platensis (Nordst.) Geitler = *Arthrospira platensis* (Nordst.) Gomont. Monogr. Osci.: 247, 1893

Tricoma homocistino, espiralado, levemente constricto a nivel de los tabiques; sin vaina. Células más cortas que anchas; la terminal redondeada y sin caliptra, granulaciones a nivel de los tabiques. *Dimensiones celulares*: ancho: 6 - 10,6 μm ; largo: 1,5 - 5,3 μm . Tricoma: distancia entre espiras: 40-42 μm ; ancho de las espiras: 24 a 30,7 μm .

Observaciones: en algunos casos los ejemplares hallados difieren de la especie tipo porque las células son algo más anchas (diámetro celular: 6 - 8 μm ; ¹⁰).

Género *Oscillatoria* Vaucher

Oscillatoria annae van Goor

Tricoma homocistino, recto, isopolar ligeramente constricto; célula terminal redondeada, sin caliptra ni engrosamiento. *Dimensiones celulares*: ancho: 6,7-10,6 μm ; largo: 2,0-4,0 μm . (Figuras 1.2 y 2.6)

Oscillatoria irrigua Kützing

Tricoma homocistino, recto, ligeramente atenuado hacia los extremos, con leves constricciones a nivel de los tabiques; célula terminal con engrosamiento, sin granulaciones a nivel de los septos. *Dimensiones celulares*: ancho: 8,0-9,0 μm (la de los extremos 6,0-7,3 μm); largo: 2,0-4,66 μm (Figura 1.5).

Observaciones: los ejemplares hallados difieren de la especie tipo por la longitud menor de sus células. Según algunos autores ¹⁵, ésta especie se la reclasificó dentro del género *Phormidium* como *Phormidium irriguum*.

Oscillatoria nigra Vaucher

Tricoma homocistino, heteropolar, ligeramente constricto a nivel de los tabiques; célula terminal redondeada, sin caliptra ni engrosamiento. *Dimensiones celulares*: ancho: 8-10 μm (la de los extremos 7,3-10 μm); largo: 3,3-4,6 (la de los extremos 6 μm ; Figura 1.3).

Observaciones: los ejemplares hallados difieren de la especie tipo en que no presentan granulaciones a nivel de los septos. Al igual que la anterior, de acuerdo a algunos autores ¹⁵, a esta especie se la clasifica como *Phormidium nigrum*.

Género *Phormidium* Kützing ex Gomont

Phormidium subfuscum Kützing

Tricoma homocistino, ligeramente curvo, heteropolar, con ligeras constricciones a nivel de los tabiques; célula terminal capitada. *Dimensiones celulares*: ancho: 6,6-9,3 (la de los extremos 6,6-9,3 μm); largo: 1,6-4 (la de los extremos 4,6-6 μm ; Figuras 1.4, 2.7 y 2.8).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La presencia de diferentes especies de *Oscillatoria* y de *Phormidium subfuscum*, halladas en gran proporción en la muestra C, indujo a buscar antecedentes acerca de sus usos y propiedades. De acuerdo a la bibliografía consultada éstos taxa no reúnen propiedades similares a las de *Spirulina* ni se ha aislado de ellos

los mismos metabolitos que caracterizan a esta última. Además, tampoco se registra en la bibliografía su uso por grupos étnicos, como es el caso de *Spirulina*.

Por el contrario, los datos hallados se refieren a aplicaciones diferentes. Ellas aluden a un compuesto anticancerígeno, debromoaplysiatoxina, hallado en miembros de la Familia *Oscillatoriaceae*, de ambientes marinos. Dicho compuesto, se aisló de *Lyngbya gracilis* y se halla presente también en *Oscillatoria nigroviridis*. Se reportó que éste también posee actividad antiviral en extractos de lípidos de *Lyngbya majuscula* ¹⁶. Asimismo, se cita la acción antiviral y antitumoral de *Phormidium tenue* y *Lyngbya lagerheimii*, que han mostrado buena protección ante efectos patológicos celulares de HIV en linfocitos-T humanos ¹⁷.

Evidentemente, la presencia de otras especies diferentes a *Spirulina platensis* en las muestras C y D demuestran que se trata de una contaminación. Esta tal vez pudo tener su origen en el hecho que los requisitos nutritivos provistos por el medio de cultivo utilizado son apropiados para que prosperen diversas *Cyanophyta* ¹⁸. Por otra parte, se desconoce si el material fue obtenido por cultivo o recolectado de una población natural, a partir de una floración algal. En este último caso, si bien la mayor cantidad de biomasa correspondería a la especie responsable del "bloom" algal, no sería difícil encontrar en el mismo habitat a organismos tales como *Oscillatoria* y/o *Phormidium*. Con respecto a esto último, es interesante destacar que a concentraciones de sal de entre 2,5 y 30 g/l, las *Cyanophyta* pueden ser dominantes, prosperando entre otras *Oscillatoria* spp. ¹⁹.

Finalmente, la falta de un control de calidad adecuado combinado con insuficiente información en lo que respecta a la identificación y clasificación del material, pudo haber contribuido a la contaminación mencionada.

Agradecimientos. Las autoras desean expresar su agradecimiento a los Dres. Ricardo O. Echenique y Sebastián Guarrera por la lectura crítica del manuscrito; al Lic. Andrés Boltovskoy por su asesoramiento y participación en el tratamiento del material para microcopio electrónico y a la Srta. Nilda Malacalza por el entintado de los dibujos y el armado de las láminas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Farrar, W.V. (1966) *Nature* **5047**: 341-2
2. Durand-Chastel, H. (1980) "Production and use of Spirulina in Mexico", en "*Algae biomass*" (G. Shelef & C. J. Soeder, Eds.) Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, págs. 51-63
3. Leonard, J. (1966) *Nature* **209**: 126-8
4. Sironval, C. (1993) "La Spiruline, une arme contre la malnutrition, historie et perspectives", en "*Spiruline, algue de vie*" (Doumenge, F., H.Durand-Chastel & A. Toulemont, Eds.), Monaco. Musée Océanographique. Bull. de l'Institut oceanographique, Monaco. Numéro spécial 12, págs. 203-10
5. Fox, D. (1993) "Health benefits of Spirulina and proposal for a nutrition test on children suffering from Kwashiorkor and Marasmus", en "*Spiruline, algue de vie*" (Doumenge, F., H.Durand-Chastel & A. Toulemont, Eds.). Monaco. Musée Océanographique. Bull. de l'Institut oceanographique, Monaco. Numéro spécial 12, págs. 179-86
6. Durand-Chastel, H. (1993) "La Spiruline, algue de vie", en "*Spiruline, algue de vie*" (Doumenge, F.; H.Durand-Chastel & A. Toulemont, Eds.). Monaco. Musée Océanographique. Bull. de l'Institut oceanographique, Monaco. Numéro spécial 12, pags. 7-12

7. Pascaud, M. (1993) "The essential polyunsaturated fatty acids of *Spirulina* and our immune response", en "*Spiruline, algue de vie*" (Doumenge, F., H.Durand-Chastel & A. Toulemont, Eds.). Monaco. Musée Océanographique. Bull. de l'Institut oceanographique, Monaco. Numéro spécial 12, págs. 49-58
8. Harbone, J.B. & H. Baxter (Eds.) (1993) *Phytochemical dictionary. Handbook of bioactive compounds from plants*. Taylor and Francis, London-Washington, DC., pág. 72
9. Fremy, P. (1930) *Arch. Bot.* 3 (2): 1-508
10. Geitler, L. (1932) "Cyanophyceae", en *Rabenhorst, Krypt. Flora Deustch., Osterr. und Schw.*, 14: 1190 págs.
11. Desikachary, T.V. (1959) "*Cyanophyta*". Ind. Counc. Agr. Res. New Delhi, 686 págs.
12. Doumenge, F. & A. Toulemont (1993) "Avant-Propos", en "*Spiruline, algue de vie*" (Doumenge, F., H.Durand-Chastel & A. Toulemont, Eds.). Monaco. Musée Océanographique. Bull. de l'Institut oceanographique, Monaco. Numéro spécial 12, págs. 5-6
13. Boltovskoy, A. (1995) "Técnicas de microscopía electrónica de barrido: aplicación a las microalgas", en "*Manual de métodos ficológicos. Micro y macroalgas*". (Alveal, K., M.E. Ferrario, E.C. Oliveira & E. Sar, Eds.). Univ. de Concepción, Concepción, págs. 119-38
12. Bourrelly, P. (1985) "*Les algues d'eau douce*". III. Ed. N. Boubée, París, 606 págs.
13. Anagnostidis, K. & J. Komárek (1988) *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 80, 1-4 (Algol. Stud. 50-53): 327-472
16. Mynderse, J.S., R.E. Moore, M. Kashiwagi & T.R. Norton (1977) *Science* 196: 538-40
17. Lednicer, D. & K.M. Snader (1991) "Plants and other organisms as a source of anti-human immunodeficiency virus (HIV) drugs", en "*Economic and Medicinal Plant Research*" (H. Wagner & N.R. Farnsworth, Eds.). Vol 5, págs. 1-20
18. Kufferath, H. (1930) "La culture des algues", en "*La revue algologique*". París. 222 págs.
19. Gallegos, A.J. (1993) "The past, present and future of algae in Mexico", en "*Spiruline, algue de vie*" (Doumenge, F., H.Durand-Chastel & A. Toulemont, Eds.). Monaco. Musée Océanographique. Bull. de l'Institut oceanographique, Monaco. Numéro spécial 12, págs. 133-40