

COMUNICACIONES *BREVES*

**CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE DERIVADOS
COMERCIALES DE LA CIANOBACTERIA *SPIRULINA***

CESAR LORETO, GISELA FUENMAYOR, BELTRÁN BRICEÑO,
NÉSTOR ROSALES Y EVER MORALES¹

*Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento
de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia,
Apartado 526, Maracaibo, Venezuela*

¹*Autor de correspondencia: everm@iamnet.com*

Resumen. Se evaluó la calidad bioquímica y microbiológica de siete productos encapsulados de la cianobacteria *Spirulina* comercializados en Venezuela y otros países. Se determinó el contenido (mg g⁻¹) de clorofila *a* (4,6–20,2), carotenoides (ND–1,3), carbohidratos (385,6–683,7), proteínas (249,9–469,3), lípidos (353,5–702,5), ficocianina (trazas–325,4), bacterias y hongos, y se aplicó la prueba de toxicidad sobre *Artemia* sp. La presencia de clorofila *a*, ficocianina y de tricomas se utilizaron como marcadores de *Spirulina*. En ninguno de los productos se detectaron mohos ni levaduras, pero solamente un producto resultó libre de bacterias. Uno de los productos no reveló presencia de tricomas, ni de clorofila y sólo se detectaron trazas de ficocianina; además, fue positivo para coliformes totales y fecales. Todos los productos probados fueron tóxicos sobre *Artemia* sp. *Recibido: 02 agosto 2006, aceptado: 12 febrero 2007.*

Palabras clave: Control microbiológico, derivados comerciales, *Spirulina*, toxicidad, pigmentos, proteínas.

MICROBIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL QUALITY OF
COMMERCIAL PRODUCTS CONTAINING THE CYANOBACTERIUM *SPIRULINA*

Abstract. Microbiological and biochemical quality of seven encapsulated *Spirulina* (cyanobacteria) products marketed in Venezuela and other countries were evaluated. We determined (mg g⁻¹) chlorophyll *a* (4.6–20.2), carotenoids (ND–1.3), carbohydrates (385.6–683.7), proteins (249.9–469.3), lipids (353.5–702.5), phycocyanin content (traces–325.4), presence of bacteria and fungi, and toxicity to *Artemia*. Phycocyanin, chlorophyll *a* and trichomes were used as markers for *Spirulina*. Molds and yeasts were not detected, but only one product was bacteria free. One product revealed neither trichomes nor chlorophyll *a*, and only traces of

phycocianin. Furthermore, the product was positive for total and fecal coliforms. All products were toxic to *Artemia* sp. *Received: 02 August 2006, accepted: 12 February 2007.*

Key words: Microbiological control, commercial products, *Spirulina*, toxicity, pigments, proteins.

Entre los diversos estudios realizados con *Spirulina* se ha descrito su actividad biológica antiviral, antihistamínica, antiinflamatoria e inmunoes-timulante. Por lo que actualmente presenta gran interés en biotecnología para la elaboración de productos formulados a base de esta cianobacteria. En diversos países se ha promovido su utilización por sus propiedades terapéuticas, nutricionales y como fuente de colorantes y aditivos para las industrias farmacéutica y alimentaria (Liang *et al.* 2004). Los estudios sobre análisis químicos y microbiológicos de productos derivados de microalgas utilizados como suplemento alimenticio son escasos ya que las empresas responsables de su elaboración raramente divulgan los resultados de sus estudios y sus controles de calidad a la comunidad científica. Por otro lado, las disposiciones legales que regulan su comercialización no son del todo claras, lo que implica una falta de información para los consumidores y administradores de salud (Ortega-Calvo *et al.* 1993). Hasta el presente, en Venezuela y otros países latinoamericanos, no se han realizado estudios sobre esta clase de productos a base de *Spirulina*. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es evaluar la calidad bioquímica y microbiológica de los derivados comerciales de *Spirulina* manufacturados en otros países y comercializados no sólo en Venezuela, sino en otros países del continente americano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron siete productos de *Spirulina* sp., manufacturados en Perú, Estados Unidos y Canadá, presentados en forma de comprimidos o encapsulados. Todas las muestras se colectaron en farmacias y tiendas de productos naturales y se encontraban dentro del periodo de uso efectivo, según la fecha de expiración de la etiqueta. A cada uno de los productos evaluados se les asignó un código que consistió en la letra S seguida de un número.

Se disolvió 1 g de cada producto en 10 mL de medio de cultivo ALGAL (Fábregas *et al.* 1984) a fin de verificar la presencia de *Spirulina*. Las muestras, por triplicado, se mantuvieron en tubos de ensayos durante 10 días bajo condiciones de laboratorio. Además, se determinó la concentración de

bacterias heterótrofas aerobias, mohos y levaduras, morfología y tinción de Gram de los microorganismos aislados. Los productos con bacilos Gram negativos fueron evaluados para determinar coliformes totales y coliformes fecales (APHA 1998). La determinación de clorofila *a* y carotenoides se realizó por HPLC, extraídos en metanol anhidro y analizados según las condiciones descritas por Vidussi *et al.* (1996). La ficocianina se extrajo mediante el método de shock osmótico (Wyman y Fay 1986) y calculada utilizando la ecuación de Bennet y Bogorad (1973). Las proteínas se determinaron por método de Lowry *et al.* (1951). El método fenol-sulfúrico (Kochert 1978) se usó para la determinación de carbohidratos y los lípidos se determinaron por el método de carbonización simple (Marsh y Weinstein 1966). Las pruebas de toxicidad se realizaron con *Artemia* sp., según la metodología descrita por Lee *et al.* (1999). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS 10.0 para Windows, utilizando un análisis de varianza (ANOVA) ($P=0,05$) y la prueba de Sheffé para examinar las diferencias en la composición bioquímica entre los diferentes productos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis microscópico reveló que seis de los productos poseen fragmentos de tricomas de *Spirulina*. El producto S-1 fue el único que presentó restos celulares no identificables como tricomas de la cianobacteria.

De los productos que presentaron bacilos Gram negativos (Tabla 1), S-2 estuvo exento de coliformes totales y coliformes fecales. No obstante, S-1 presentó 6,9 NMP 100 mL⁻¹ de coliformes totales y 3,6 NMP 100 mL⁻¹ de coliformes fecales. Asimismo, ninguna de las muestras resultó positiva para mohos y levaduras. La mayor concentración de bacterias heterótrofas aerobias fue detectada en S-1 y S-4 (Tabla 1). La presencia de bacterias en la mayoría de los productos evaluados puede deberse a que *Spirulina* es recolectada a partir de sistemas a cielo abierto y no de sistemas de cultivo artificiales en los que se controlan las condiciones de crecimiento, lo cual hace más probable la existencia de bacterias (Henrikson 1994).

El producto S-2 presentó los mayores valores de clorofila *a* con $20,16 \pm 1,26$ mg g⁻¹ y con diferencias significativas ($P < 0,05$) (Tabla 2). El porcentaje de clorofila *a* para S-2, S-3, S-6 y S-7 osciló entre 1 y 2%, los cuales son ligeramente superiores a los reportados para tres productos comercializados en España; con porcentajes entre 0,86 y 0,93% (Chapman y Chapman 1980), pero similares a los reportados por la Compañía Earthrise Farms (Earthrise Farms 1998) de 1,15%. El mayor contenido de carotenoides se obtuvo con S-6 de

$1,29 \pm 0,22 \text{ mg g}^{-1}$ ($P < 0,05$). En el producto S-1 no se detectaron clorofila ni carotenoides.

Tabla 1. Concentración de bacterias heterótrofas aerobias, tipos y características morfológicas de las colonias presentes en los productos comercializados en Venezuela de la cianobacteria *Spirulina*.

P	UFC g ⁻¹	Colonias	Características de Colonias	Morfología	Gram
S-1	$6,4 \times 10^3$	2	Pequeña, color crema	Bacilo	Negativo
			Mediana color crema	Bacilo	Positivo
S-2	1×10^3	3	Grande, opaca	Bacilo	Positivo
			Crema, translúcida	Bacilo	Negativo
S-3	NC	ND	Pequeña y translúcida	Coco	Positivo
S-4	$6,6 \times 10^4$	2	Mediana crema	Bacilos en cadena	Positivo
			Amarillenta	Coco	Positivo
S-5	$3,7 \times 10^3$	1	Grande, borde rugoso, crema	Bacilos en cadena	Positivo
S-6	7×10^3	2	Blanquecina	Bacilos en cadena	Positivo
			Pequeña transparente	Coco	Positivo
S-7	200	2	Crema	Bacilos en cadena	Positivo

NC: No hubo crecimiento. ND: no determinada.

Tabla 2. Contenido de pigmentos, carbohidratos, proteínas y lípidos de los productos comercializados en Venezuela de la cianobacteria *Spirulina* (promedio $\pm$ desvest)

P	Clorofila <i>a</i>	Carotenoides	Carbohidratos	Proteínas	Lípidos
S-1	ND	ND	$617,74 \pm 12,6$	$392,65 \pm 4,8$	$284,2 \pm 18,3$
S-2	$20,16 \pm 1,3$	$0,95 \pm 0,2$	$630,93 \pm 7,2$	$469,29 \pm 22,7$	$599,4 \pm 34,1$
S-3	$12,11 \pm 0,9$	$0,56 \pm 0,1$	$647,73 \pm 14,9$	$375,33 \pm 10,5$	$537,8 \pm 47,1$
S-4	$4,56 \pm 0,6$	$0,35 \pm 0,0$	$518,17 \pm 9,1$	$249,86 \pm 1,8$	$427,0 \pm 46,5$
S-5	$6,21 \pm 0,7$	$0,40 \pm 0,1$	$385,62 \pm 15,7$	$341,73 \pm 13,7$	$570,7 \pm 21,9$
S-6	$10,63 \pm 0,9$	$1,29 \pm 0,2$	$481,58 \pm 9,4$	$412,07 \pm 13,2$	$702,5 \pm 13,9$
S-7	$10,01 \pm 1,0$	$1,15 \pm 0,3$	$683,71 \pm 4,2$	$259,84 \pm 11,9$	$353,5 \pm 34,3$

ND: No detectable; Todos los valores expresados en mg g^{-1} .

El mayor valor de ficocianina, de $325,43 \pm 9,90 \text{ mg g}^{-1}$ se obtuvo para el producto S-6 ($P < 0,05$). Los valores obtenidos para el resto de los productos oscilaron entre $144,12$ y $280,39 \text{ mg g}^{-1}$, a excepción de S-1 que sólo presentó trazas del pigmento (Fig. 1). Es importante indicar que la concentración de ficocianina en los productos elaborados a base de *Spirulina*, está relacionada con una alta calidad de la biomasa cosechada de esta cianobacteria, lo cual contribuye a un mayor valor agregado. Entre las propiedades biológicas de este pigmento se encuentran el de ser una proteína de reserva y a la vez confiere efectos inmunomoduladores (Henrikson 1994).

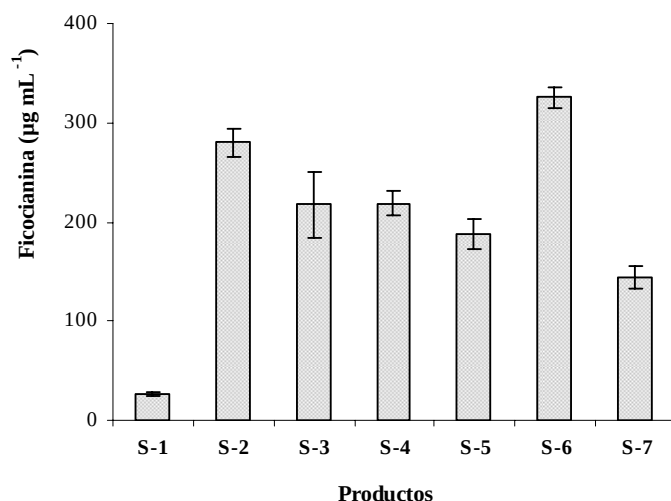


Figura 1. Contenido de ficocianina de productos comercializados en Venezuela a base de la cianobacteria *Spirulina*.

El contenido de proteínas fue mayor para el producto S-2 con $469,29 \pm 22,71 \text{ mg g}^{-1}$ ($P < 0,05$) (Tabla 2). Sin embargo, estos valores son inferiores a los reportados para la cianobacteria tanto en cultivos de laboratorio como en productos comercializados (Chapman y Chapman 1980, Henrikson 1994). Por el contrario, la concentración de carbohidratos osciló entre $683,71 \pm 4,16$ y $385,62 \pm 15,72 \text{ mg g}^{-1}$, para S-3 y S-5, respectivamente y son considerablemente superiores a los reportados por Ortega-Calvo *et al.* (1993). Estos valores pueden ser el resultado de la inclusión de ingredientes adicionales, al menos en S-3, S-5 y S-7 con celulosa vegetal, croscarmelosa y polvo de trigo y durazno respectivamente. El contenido de lípidos obtenido en este estudio resultó más alto que el reportado en otros estudios sobre *Spirulina* (Ortega-

Calvo *et al.* 1993) con valores entre $284,22 \pm 18,34$ y $702,53 \pm 13,96$ mg g⁻¹ para S-1 y S-6, respectivamente ($P < 0,05$) (Tabla 2).

Todos los productos, con excepción de S-1, resultaron ser tóxicos para *Artemia* sp. a las tres concentraciones evaluadas de 30, 15 y 10 mg mL⁻¹. Es decir, se produjo un 100% de mortalidad a las 24 h para todos los productos probados. El producto S-1 no fue probado para su actividad tóxica, ya que este producto se convertía en un gel muy insoluble al hidratarse.

La división sanitaria del estado de Oregon, Estados Unidos ha encontrado niveles de microcistina LR en 50 de 67 muestras obtenidas a partir de recolectores, mayoristas y minoristas de algas verde-azules por encima de 1 ppm (Anon 1999). Asimismo, se han reportado 43 eventos adversos relacionados con el consumo de suplementos dietéticos a base de algas verde-azules por parte del Sistema de Monitoreo de Eventos Nutricionales Adversos de la FDA. Sin embargo, no hay información disponible sobre condiciones preexistentes, y tampoco hay certeza de que un evento adverso reportado pueda ser atribuido a un producto o ingrediente particular (FDA 1998).

Se comprobó que todos los encapsulados probados, a excepción del producto S-1, correspondían a productos manufacturados a partir de biomasa liofilizada de la cianobacteria *Spirulina*. Además, se comprueba que la mayoría de dichos productos poseen una buena calidad nutricional en cuanto a contenido de clorofila, ficocianina y proteínas, siendo el producto S-3 el de mejor calidad microbiológica. Por otro lado, no se puede afirmar que el producto S-1 sea realmente *Spirulina*, debido a la ausencia de tricomas y a la presencia de sólo trazas de ficocianina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por el apoyo financiero a través del proyecto S1-2000000786.

LITERATURA CITADA

- ANON, C. 1999. New understanding of algae. *Environ. Health Perspect.* 107(1): 3–4.
- APHA. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater (20 ed.). Washington D.C., EE.UU.
- BENNET, A. Y L. BOGORAD. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue green alga. *J. Cell Biol.* 58: 419–435.

- CHAMORRO, G., M. SALAZAR, K. LIMA, C. PEREIRA, G. CEBALLOS Y C. FABILA. 2002. Actualización en la farmacología de *Spirulina* (*Arthrospira*), un alimento no convencional. Arch. Latinoamer. Nutr. 52: 232–240.
- CHAPMAN, V. Y D. CHAPMAN. 1980. Seaweeds and their uses. Editorial Chapman & Hall, Londres, Reino Unido.
- EARTHRIS FARM. 1998. Five years testing of heavy metals in *Spirulina*, 1983–1987. Informe Técnico, Earthrise Farms, Los Angeles, EE.UU.
- FÁBREGAS, J., J. ABALDE, C. HERRERO, B. CABEZAS Y M. VEIGA. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. Aquaculture 42: 207–215.
- FDA. 1998. The SN/AEMS Web Report. (Documento en línea). Disponible en: <http://vm.cfsan.fda.gov/tear/aems>. Revisado el 30 de Mayo 2005.
- HENRIKSON, R. 1994. Microalga *Spirulina*, superalimento del futuro. Ediciones Urano, Barcelona, España.
- KOCHERT, G. 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. Pp. 95–97, en J. Hellebust y J. Craigie (eds.), Handbook of phycological methods. Physiological and biochemical methods. Cambridge Univ. Press, Cambridge, Reino Unido.
- LEE, T., Y. CHEN Y H. CHOU. 1999. Toxicity assay of cyanobacterial strains using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay. Acta Zool. Taiwanica 10: 1–8.
- LIANG, S., X. LIU, F. CHEN Y Z. CHEN. 2004. Current microalgal health food R & D activities in China. Hydrobiologia 512: 45–48.
- LOWRY, O., H. ROSENBROUGH, A. FARR Y R. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Biochem. 193: 265–275.
- MARSH, J. Y D. WEINSTEIN. 1966. Simple charring method for determination of lipids. Journal Lipid Res. 7: 574–576.
- ORTEGA-CALVO, J., C. MAZUELOS, B. HERMOSIN Y C. SAIZ-JIMENEZ. 1993. Chemical composition of *Spirulina* eukaryotic algae food products marketed in Spain. J. Appl. Phycol. 5: 425–435.
- VIDUSSI, F., H. CLAUSTRE, J. BUSTILLOS, C. CAILLIAU Y J. MARTY. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll *a* from divinyl-chlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. J. Plankton Res. 18: 237–282.
- WYMAN, M. Y P. FAY. 1986. Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (cyanobacteria), i. The influence of light quality. Proc. Royal Soc. London B 227: 367–380.