

CAPÍTULO 10

Potencial riesgo a la salud de los suplementos dietarios que contienen algas azul-verdosas

Leda Giannuzzi

CÁTEDRA DE TOXICOLOGÍA, FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN CRIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (CIDCA). CONICET, UNLP, LA PLATA

Resumen

Los suplementos dietarios que contienen algas verdes azuladas (**SAVA**), son reconocidos y fáciles de conseguir ya que se venden como nutracéuticos sin receta en las farmacias, en los supermercados o herbolarios, así como a través de Internet. La especie más utilizada en los suplementos dietarios son *S. máxima* (Setchell y Gardner) Geitler, *S. platensis* y *Aphanizomenon flos-aquae*. Estas estirpes pueden coexistir con otras cianobacterias potencialmente tóxicas que comparten el mismo hábitat, como *Microcystis sp.* Por ello, se deduce que los productos SAVA pueden resultar contaminados por toxinas producidas por otros organismos no deseados y ser co-cosechado accidentalmente. En base a una reseña de casos de toxicidad registrados se discute la necesidad realizar un seguimiento estricto de la producción de suplementos dietarios a base de algas azul-verdosas controlando la contaminación con cianobacterias tóxicas y microorganismos patógenos así como una vigilancia rigurosa por las autoridades de la Salud con el fin de asegurar una protección adecuada a los consumidores.

1. Introducción

En la Argentina, los suplementos dietarios se encuentran incorporados al Código Alimentario Argentino (CAA) (1) desde el año 1998. En el artículo 1381, son definidos como “productos destinados a incrementar la ingesta dietaria habitual, suplementando la incorporación de nutrientes en la dieta de las personas sanas que, no encontrándose en condiciones patológicas, presenten necesidades básicas dietarias no satisfechas o mayores a las habituales. Siendo su administración por vía oral, deben presentarse en formas sólidas (comprimidos, cápsulas, granulados, polvos u otras) o líquidas (gotas, solución, u otras), u otras formas para absorción gastrointestinal, contenidas en envases que garanticen la calidad y estabilidad de los productos”. En cuanto a su composición, deben aportar nutrientes, como proteínas, vitaminas, minerales, lípidos, carbohidratos, fibras, aunque también permite el uso de algunas hierbas, inicialmente sólo las incluidas en el C.A.A.

Los alimentos nutracéuticos son alimentos o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades juntamente con capacidad terapéutica definida, aparte de su papel nutritivo básico desde el punto de vista material y energético. También son productos de origen natural con propiedades biológicas activas.

Los suplementos dietarios que contienen algas azul-verdosas (**SAVA**), son reconocidos y fáciles de conseguir ya que se venden como nutracéuticos sin receta en las farmacias, en los supermercados o herbolarios, así como a través de Internet.

Se preparan en una variedad de formas: comprimidos, polvos, cápsulas y además de las algas (seca o extractos en varias combinaciones) puede contener otros nutrientes tales como sales, vitaminas, minerales, amino ácidos. Los SAVA generalmente se presentan como promotores de la salud natural, soporte en la pérdida de peso en dietas hipocalóricas, productos que aumentan el estado de alerta y de

energía y el aumento del estado de ánimo para las personas sufren depresión y por su supuesta acción anti-inflamatoria, anti-bacterianas, anti-virales, anti-cáncer, con propiedades hipocolesterolémica, hipotriglicéridémica así como con funciones estimulantes del sistema inmune (2-5).

Por otra parte, algunos de los productos se comercializan específicamente para uso en niños como un reemplazo o alternativa para la terapia farmacológica en el llamado déficit de atención por hiperactividad (6). *Aphanizomenon flosaquae*, *Chlorella spp.*, *Spirulina spp.*, *Scenedesmus spp* son los microorganismos más frecuentemente encontrados en los productos comerciales que aportan alta calidad de proteínas, vitaminas, compuestos solubles en lípidos, glicolípidos y sulfolípidos así como aditivos e ingredientes alimentarios.

Si bien estas son las especies más citadas en la literatura, debe tenerse en cuenta que otras especies se están investigando con potencial comercial, por ejemplo, *Porphyridium spp* y *Dunaliella spp*. Su utilización como una fuente de alimento es incipiente. Es reconocido el enorme potencial que presentan para ser utilizados en los alimentos de diseño para mejorar el contenido nutricional y actuar como agentes probióticos que afectan positivamente la salud de los animales y los seres humanos.

Varias regiones del mundo como México, el norte África y China presentan una larga historia de la utilización de algas verdes azuladas (*Spirulina* y *Nostoc spp.*) como fuente de alimento (7).

El nombre *Spirulina* se refiere a un gran número de especies eubacteriales que pertenecen al phylum cianobacterias (8), la familia Spirulinaceae o Pseudanabaenaceae (9). *Spirulina* también se conoce como algas verde-azules, son especie procariotas y se han identificado treinta y cinco especies de *Spirulina* (10). La especie más utilizada en los suplementos dietarios son *S. máxima* (Setchell y Gardner) Geitler, *S. platensis* (Nordstedt) Geitler, y *S. fusiformis* Voronikhin (11). El uso de *Spirulina* ha sido ampliamente documentado desde el siglo XVI (12). *Spirulina* contiene varios nutrientes, incluyendo alrededor del 65% de proteína, vitaminas del complejo B, ficocianina, clorofila, β -caroteno, la vitamina E, la superóxido dismutasa, y numerosos minerales (10, 13, 14). Presenta también altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados y ácido linolénico (15). *Spirulina* es la primera procariota encontrada que contienen ferredoxina estable y fácilmente extraíble (16). Ficocianina es el más abundante pigmento unido a proteínas en cianobacterias y representa más del 20% de su peso seco. En vista de su contenido de nutrientes, se considera adecuado como un alimento funcional (17). Varios productos a base de *Spirulina* están disponibles en el mercado como alimentos o suplementos dietarios y en diferentes formas, incluyendo polvo o cápsulas.

Actualmente, los suplementos de algas azul-verdes (SAVA), se encuentran principalmente compuestas por productos de *Aphanizomenon flos-aquae* y *Spirulina spp*. Representan un importante fuente económica (7) y se venden principalmente en los países industrializados.

De las algas verdes, *Chlorella* también se cultiva en estanques artificiales, donde no es muy probable una contaminación con otros organismos potencialmente tóxicos. Sin embargo, *Chlorella* se encuentra a menudo mezclada en proporciones variables con otros productos tales como *A. flos-aquae*, como se puede observar a partir de los productos comercializados.

Aphanizomenon flos aquae y *Spirulina sp* pueden coexistir con otras cianobacterias potencialmente tóxicas que comparten el mismo hábitat, como *Microcystis sp*. Por ello, se deduce que los productos SAVA pueden resultar contaminados por toxinas producidas por otros organismos no deseados y ser co-cosechado accidentalmente (6). La contaminación de los suplementos dietarios que contienen de forma natural *A. aquae flos* con *Microcystis aeruginosa* productora de microcystinas (MCs), ha sido informada por diversos autores (18,19).

Spirulina maxima es considerada no tóxica (20, 21), sin embargo Draisci (22) identificó dos toxinas Epoxyanatoxin-a y Dihydrohomoanatoxin-a en concentraciones que van desde no detectable a 19 mg/g peso seco en el suplemento dietario obtenido a partir de *Spirulina*.

En los lagos alcalinos en Kenia, se encontró que *Arthrospira fusiformis* (Syn fusiformis *Spirulina platensis*) produjo pequeñas cantidades de MCs y anatoxina-a. Estos resultados fueron encontrados utilizando técnicas de ELISA que aportaron la evidencia de una posible contaminación de los suplementos de *Spirulina* con MCs (18).

Contrariamente a *Spirulina*, en la cual la producción de toxinas está todavía en discusión, *A. flos-aquae* se sabe que es capaz de producir los alcaloides neurotóxicos como la anatoxina-a (23) y las saxitoxinas (24, 25, 26), así como el compuesto neurotóxico, ácido amino no proteico BMAA (β -Nmethylamino- L-alanine) (27).

Maatouk (28) supone que una floración de *A. flos-aquae* fue la responsable por el contenido de MCs en Saint-Caprais en Francia.

Aphanizomenon flos-aquae ha sido encontrada en los lagos naturales. Uno de sus mayores fuentes es el Lago Klamath, Oregon, donde *A. flos-aquae* co-existe y coincide con floraciones de *Microcystis sp* (7). Esta convivencia, también se puede observar en otros lagos (29, 30). En consecuencia, los consumidores de suplementos dietarios de algas azul-verdosas a base de *Spirulina* y *A. flos-aquae* se encuentran potencialmente expuestos a las toxinas producidas por las especies de cianobacterias productoras de MCs.

Sawyer y col. (31) informaron que un extracto acuoso de una floración *A. flos-aquae* del lago Klamath resultó casi instantáneamente letal para los ratones después de inyección intraperitoneal. Además, se informó que *A. flos-aquae* fue la responsable de la muerte masiva de peces (32) siendo generalmente muy tóxico para los miembros de la fauna de agua dulce. De 88 muestras de floración de Finlandia en el que *A. flos-aquae* era una de las especies predominantes, 11 de ellas fueron neurotóxicas y 25 resultaron ser hepatotóxicas (33).

Varias investigaciones informaron altas concentraciones de MCs en los productos SAVA (34, 35, 19, 36), a menudo superior al valor guía provisional de 1 $\mu\text{g/g}$ peso seco fijado por la División de Salud y el Departamento de Agricultura de Oregon (18).

Contrariamente a la exposición directa de los seres humanos a las toxinas de cianobacterias través del agua contaminada, la evaluación de riesgo que implica la exposición a través de alimentos y suplementos alimenticios resulta ser mucho más compleja. El potencial de exposición a la toxina humana a través de los alimentos que proporciona la base para los cálculos de riesgo también está determinada en gran medida por el grado de contaminación por toxinas de una fuente de alimento dado, así como por la biodisponibilidad de la toxina en los diferentes tipos de alimentos. La principal diferencia es que el consumo diario de píldoras, polvos y bebidas es muy difícil de estimar. Además, estos productos a menudo son manipulados como si fueran productos farmacéuticos. El consumo por persona no se corresponde con el peso corporal como es el caso para las fuentes reales de los alimentos, por ejemplo, peces, cangrejos, etc.

2. Informes sobre suplementos dietarios de algas verdes azules contaminados

Aunque los proveedores de SAVA conteniendo estirpes de *Aphanizomenon flos-aquae* informan niveles de MC menores de 1.0 $\mu\text{g/g}$ peso seco en sus productos (7), investigaciones independientes han encontrado niveles de MCs de 35 $\mu\text{g/g}$ peso seco en los productos dietarios (35).

Vichi y col. (37), informaron que el 100% de los productos de algas conteniendo *A. flos-aquae* estaban contaminados y aproximadamente el 40% del total analizado contenía niveles de MCs superiores a 1 $\mu\text{g/g}$. Un contenido de MCs > 1 $\mu\text{g/g}$ se encontró en 63/87 productos (72%) de los SAVA disponibles en Canadá y Estados Unidos y en 8/13 (61%) en los productos provenientes de los mercados de Alemania y Suiza (18, 34).

Más recientemente, Vinogradova y col. (35) en Irlanda informaron que en 13 productos SAVA analizados un 23% de las muestras estaban contaminadas.

Menores niveles máximos de contaminación con MCs fueron informados por Vichi y col, (37) (5.2 µg/g) mientras que los trabajos anteriores informaron un nivel de contaminación de MCs de hasta 35 µg/g por peso seco de producto (18, 35).

Los resultados analíticos para MCs utilizando LC-MS/MS mostraron que las muestras con *Spirulina* no estaban contaminadas. Vichi y col, (37), informaron que los productos de algas basadas en *Spirulina* estaban libres de contaminación, mientras que en *A. flos aquae* se detectaron niveles variables pero significativos de MCs (hasta 5.2 µg/g como la suma de los congéneres LR y LA, expresados como equivalentes de MC-LR), con la prevalencia de la MC-LR (Relación promedio LR/LA=2.29). MC-LR se ha informado que es el principal congénere de MCs detectado en SAVA (35).

3. Metodologías de detección

Los estudios de Hoeger y Dietrich, (34) y el de Lawrence et al. (35) han mostrado diferencias en cantidades de toxina detectables cuando se emplea la técnica de ELISA, inhibición de fosfatasas (PPA) y cromatografía líquida con detector de masa (LC-MS/MS). Estas diferencias parecen derivar de la falta de estándares certificados de 5 a 10 de los congéneres MCs comúnmente detectadas en SAVA, pero también puede ser debida a algunas diferencias en los congéneres de MCs que manifiestan reactividad cruzada con algunos de los reactivos empleados en las pruebas ELISA. Por ello, los valores obtenidos sólo pueden ser tomados como una estimación del contenido de MCs en SAVA. Dentro de este contexto, también es importante entender que no todos los suplementos dietarios con SAVA basados *Aphanizomenon flos-aquae* muestran altos niveles de MCs (por encima de 1.0 µg MC-LR equiv/g peso seco) y que los niveles de MCs pueden variar ampliamente de lote a lote (18, 34).

Más recientemente se desarrolló un inmunobiosensor de resonancia de plasmones superficial y validado para detectar MC en SAVA conteniendo *Spirulina* y *Aphanizomenon flos-aquae*. El ensayo fue validado de acuerdo con los criterios de desempeño señalados en la legislación 2002/657/CE de la Unión Europea. El ensayo del biosensor se aplicó con éxito para detectar toxinas MC-LR en muestras SAVA en el mercado minorista de Irlanda. MC-LR se detectó en muestras en niveles que entre 0.5 a 21.2 µg/g. Los resultados de biosensores correlacionaron adecuadamente con la metodología LC-MS /MS (38).

Los suplementos dietarios conteniendo algas azul verdosas son una matriz compleja y en consecuencia deben realizarse métodos adicionales con el fin de optimizar el procedimiento de detección MCs por LC-MS / MS y seleccionar el mejor procedimiento de preparación de la muestra, así como para detectar el posible efecto de la matriz asociada a la diferente composición de productos. Vichi y col (37) mostraron que, la detección de MCs se vio afectada significativamente por la matriz; de hecho, durante los procedimientos de extracción y preparación de la muestra fueron eliminadas parcialmente diversas sales que presentaban influencia en la ionización de las muestras.

En algunos casos, se aplicaron métodos de inmunoensayos de carácter semi-cuantitativos donde la especificidad (o reactividad cruzada) del anticuerpo utilizado resulta ser muy relevante para la correcta interpretación de los datos. A pesar de ser el método de inmunoensayo altamente específico, algunos congéneres no pueden ser detectados. Este es el caso para el recientemente biosensor desarrollado, en el que el anticuerpo utilizado (MC10E7) no mostró reactividad cruzada con MC-LA, -LW y -LF (38). El uso de dicho biosensor, no reveló la presencia de MC-LA, lo cual habría causado una subestimación importante del nivel de contaminación de SAVA analizado.

Por el contrario, cuando la especificidad fue menor, la comparación entre los resultados obtenidos con ELISA y LC-MS/MS a menudo indica una aparente sobrestimación de los valores MC; esto se debe a la presencia de variantes no analíticamente probadas, pero capaces de reaccionar de forma cruzada con el

anticuerpo en un lugar inespecífico utilizado en el ensayo ELISA. El ensayo inmunológico es adecuado como método de cribado rápido para detectar contaminación en SAVA, mientras que los resultados de los congéneres son útiles para una evaluación adecuada del riesgo. En este caso específico, la presencia y cuantificación los diferentes congéneres deben ser cuidadosamente considerados para realizar la correcta evaluación de riesgos de salud humana de SAVA.

4. Reseña de casos registrados

Se sospecha que los suplementos dietarios de algas verdes azules obtenidas a partir de *Spirulina* son los responsables de la lesión hepática de una mujer japonesa de 52 años de edad. Iwasa et al. (39) informaron concentraciones elevadas de enzimas hepáticas en la paciente que utilizaba un producto a base de *Spirulina* durante 5 semanas. La paciente tenía antecedentes de hipertensión, hiperlipidemia y diabetes mellitus tipo 2, y había tomado simvastatina y amlodipino durante 7 meses. Desafortunadamente el informe no discutió la posibilidad bien documentada que una estatina tal como la simvastatina podría causar daño en el hígado. El informe concluyó que la reacción adversa posiblemente estaba relacionada a *Spirulina* porque las concentraciones de enzimas del hígado de la paciente disminuyeron después de retirar la *Spirulina*. Sin embargo, todos los medicamentos de la paciente fueron retirados al mismo tiempo, por lo cual otras explicaciones alternativas para la disminución de la concentración de las enzimas hepáticas no pueden ser excluidas.

Aphanizomenon flos-aquae y *S. platensis* se vieron implicados en una paciente con diagnóstico de dermatomiositis (40). La paciente era una mujer de 45 años de edad, con antecedentes de hipertensión arterial, migrañas crónicas y fibromialgia. El paciente desarrolló según se informa enrojecimiento en la cara y en los nudillos de sus manos en un plazo de 1 a 2 días después del uso de un suplemento compuesto por *A. flos-aquae* y *S. platensis*, pimienta de cayena orgánica, metilsulfonilmetano (también conocido como MSM). Ella suspendió el consumo, sin embargo un mes más tarde reanudó el consumo junto con otro producto de varios ingredientes que contenían enzimas digestivas. Cuatro días después de la re-exposición con el suplemento, se informó empeoramiento de la erupción, incluyendo una importante hinchazón en la cara, los ojos y los oídos. Investigaciones posteriores revelaron un alto título de anticuerpos y un diagnóstico de dermatomiositis apoyado con la biopsia. Estudios posteriores mostraron que la paciente era heterocigota para el factor de necrosis tumoral 308A- α (TNF- α) con polimorfismo que puede predisponer genéticamente un individuo a la autoinmunidad (40).

El Comité de Expertos de Suplementos Dietarios (DSI-CE) (41), considera que este informe de caso como un ejemplo clásico de reacción idiosincrásica. En los individuos con una predisposición genética, un suplemento tal como la *Spirulina* reconocido inmunoestimulante puede ayudar a precipitar un trastorno autoinmune como la dermatomiositis. Además, el uso de un producto con múltiples ingredientes complica asignación de causalidad.

Existen registros de casos clínicos informados en (www.clinicaltrials.gov/; <http://www.controlled-trials.com/mrct/search.html>; <http://hnrin.nih.gov/>; <http://crisp.cit.nih.gov/>; y www.who.int/ictip/en). En ellos encontramos dos estudios cuyo objetivo principal fue evaluar la eficacia de la *Spirulina*. La seguridad y tolerancia no fueron informadas en estos estudios. La Biblioteca Cochrane ha indexado 18 ensayos clínicos para la evaluación del uso de *Spirulina* a largo plazo. Los ensayos se centraron en las investigaciones de eficacia y solo se informaron pocos datos en relación con los aspectos de seguridad.

Se revisaron los informes FDAMedWatch que involucran a la *Spirulina* durante el período comprendido entre enero de 2001 a julio de 2009, y se identificaron 79 informes no duplicados. De estos, 38 estaban involucrados en un tratamiento concurrente con efedra. Debido a las reacciones adversas anteriores asociados con efedra estos 38 informes fueron excluidos del presente análisis. Además, debido de la

presencia bien establecida de toxinas en ciertos géneros de las cianobacterias, incluyendo *Aphanizomenon* y *Microcystis*, los efectos adversos asociados con productos que contienen estos ingredientes fueron excluidos del análisis. En total, se identificaron 5 informes en los cuales se informaron daño hepático y 8 informes donde se presentaban otros efectos adversos. Se identificaron los efectos adversos asociados con el uso de la *Spirulina*. Los eventos adversos no graves y más comunes fueron náuseas, diarrea, vómitos, fatiga, dolor de cabeza, mareos, picazón, sarpullido y calambres abdominales. Muchos informes carecen de información sobre la cantidad de *Spirulina* consumida, el tiempo y modo de exposición, la historia del paciente y la calidad del producto. Además, estos informes no presentan un patrón de patología típico.

Tabla 1: Detalles de algunos de los casos informados

Caso número recibido	Fecha	Patología	Comentarios
# 14853	23 de abril 2001	Prueba de función hepática elevada	No se registraron otros detalles
# 14643	07 de febrero 2001	El ataque isquémico transitorio	No se registraron otros detalles
# 14926	26 de junio 2001	Diarrea severa, vómito, convulsiones, coma	No se registraron otros detalles
# 15515	28 de febrero 2002	Enzimas hepáticas elevadas, lo que resulta en la muerte	Historia clínica significativa: Hepatitis A, B, C, el uso de alcohol, ictericia y diabetes
# 14036,	21 de marzo 2003	Muerte hipercalcemia severa, deshidratación	Información no disponible
# 16471	14 de enero de 2003	Severo síndrome parkinsoniano	Producto, fabricante desconocido
# 67512	16 de enero 2004	Hepatitis tóxica	Consumo de un producto que contiene más de 50 ingredientes
# 98498	30 de noviembre 2007	Elevada enzimas hepáticas	Paciente estaba usando Depo-Provera y varios polihierbal y multivitamínico combinaciones que contienen espirulina
# 102994	05 de mayo 2008	Enrojecimiento en parte superior del cuerpo	Inflamación de la garganta acontecimiento adverso grave en vista de la garganta cerrada
# 103049	06 de mayo 2008	Shock anafiláctico	Paciente se trató en sala de emergencia
# 110611	13 de febrero 2009	Enzimas hepáticas elevadas inducida por medicamentos, lupus, pérdida de cabello, coágulos en sangre	El informe de la paciente indicó reacciones al uso de un producto que contiene espirulina y varios ingredientes
# 113558	20 de mayo 2009	Corazón: palpitaciones Una mujer de 37 años de edad, reacción una semana después de usar un producto que contiene espirulina y varios ingredientes	Fabricante informó que la muestra retenida contenía las especificaciones

Estos informes fueron asociados con el consumo de diferentes suplementos dietarios que contienen *Spirulina*, sin embargo su contenido resultó desconocido. El # 16471 identifica el producto simplemente como "algas azul-verde" que no fue analizado. Las manifestaciones neurológicas de este informe son consistentes con los producidos por las neurotoxinas anatoxina o saxitoxina, que indica la posibilidad de contaminación con otras cianobacterias tales como *Anabaena*, *Oscillatoria*, o *Aphanizomenon*.

Heussner y col, (42) estudiaron la citotoxicidad de diferentes suplementos dietarios adquiridos en el comercio de Alemania sobre células epiteliales de alveolos humanas. Los extractos de todos los productos

analizados fueron citotóxicos. La citotoxicidad encontrada sugiere que componentes adicionales pueden estar presentes y pudiendo inducir efectos adversos fulminantes en los consumidores. A la luz de estos resultados, los autores concluyen que la distribución y la venta comercial de productos conteniendo *A. flos-aquae*, en formulaciones puras o mixtas para el consumo humano resulta ser muy cuestionable. Los componentes citotóxicos en los extractos de los suplementos dietéticos no fueron identificados aunque se sabe que las algas absorben fácilmente los metales pesados, por ejemplo, plomo o mercurio y puede dar lugar a niveles de contaminación en los productos cosechados de niveles del orden de mg/g. Sin embargo, la citotoxicidad observada en los ensayos puede proporcionar una explicación para los efectos adversos agudos informados por algunos consumidores de estos productos tales como náuseas, vómitos, diarrea, estreñimiento y malestar estomacal (43).

Las reacciones alérgicas (asma, sibilancias, fiebre, conjuntivitis, irritaciones de la piel) también se han informado como resultantes de interacciones medicamentosas con antihistamínicos, anticoagulantes y medicamentos contra la diabetes. Varios informes de casos corroboran los riesgos para la salud asociados con el consumo de suplementos dietéticos de algas. Se informó rabdomiolisis aguda en un hombre de 28 años después de la ingestión de suplementos de espirulina durante un mes (44), convulsiones generalizadas asociados con hipercalcemia en un recién nacido que se lo relacionó con el consumo de la madre de suplementos de *Spirulina* durante largo plazo y anafilaxia se informó en un adolescente de 14 años de edad que había experimentado previamente urticaria, edema labial y asma 6 horas después del consumo de cinco tabletas de *Spirulina* (45).

5. Derivación de la concentración máxima permitida de MCs

A efectos de desarrollar el valor de ingesta diaria tolerable (IDT) y una concentración máxima permisible para MCs en los productos de SAVA, se aplica la metodología de evaluación de riesgo (46).

El valor de IDT está basada en el nivel de efecto adverso no observado para la MC-LR en ratones (NOAEL) (47) con la aplicación de factores de incertidumbre estándar (FI) (46). El enfoque es similar al utilizado por Health Canada (48) y la Organización Mundial de la Salud (49) al desarrollar niveles de referencia para MCs en agua potable. Al valor de NOAEL de 40 µg/kg-día dado por Fawell y col, (47), se aplicó un factor de incertidumbre total de 1000 veces, lo que resultó en un valor de IDT de 0.04 µg/kg-día. Aplicando este resultado a una persona adulta de 60 kilos resulta en 0.04 µg/kg-día x 60 kg = 2.4 µg/día. Suponiendo a 2 g/día la tasa de consumo de SAVA (basado en la literatura del producto y discusiones con los productores de SAVA y consumidores), $2.4 \mu\text{g} / \text{día} \div 2 \text{ g SAVA} / \text{día} = 1.2 \mu\text{g/g} \approx 1.0 \mu\text{g/g}$ de peso seco. Por lo tanto, se determinó que 1 µg/g para los adultos, es un nivel seguro de MCs en los productos denominados SAVA.

Considerando que el cálculo del nivel tolerable de MC en SAVA fue evaluado para adultos, los niños (por ejemplo, 10 a 20 kg de peso corporal) habrían de estar expuestos a tres a seis veces el equivalente de concentraciones de MC-LR por día. Así, en el peor de los casos (1.0 µg MC-LR / g SAVA y la ingesta diaria de 10 g SAVA), los niños podrían ingerir hasta 30 veces el valor de MC equivalentes a la considerada ingesta segura durante semanas, meses o incluso años. Como los SAVA se comercializan con la clara intención de la suplementación de los lactantes y los niños con déficit de atención por hiperactividad (6), claramente se demuestra que el consumo de 2 g por día de SAVA incluso con un nivel residual de 1 µg MC-LR / g peso seco excede el valor de IDT de los lactantes (5 kg de peso) y los niños (20 kg de peso) por un factor de 10-33 y 2.5 a 7.7, dependiendo del valor de IDT elegida. Si se ingieren mayores cantidades diariamente, en el peor de los casos (8 g SAVA por día) puede superar el valor de IDT por un factor de 40 a 123 y 10 a 31 en los lactantes y niños.

Varios análisis independientes (34, 18, 35) ha detectado más de 1.0 µg MC-LR equiv./g peso seco en 50-100% de los SAVA analizados, lo que fuertemente sugiere que debe asumirse una importante exposición

de los consumidores de estos productos. En efecto, estos datos y la comparación de los valores de orientación calculados para los SAVA aplicado a los lactantes y niños en diferentes dosis diarias demuestran fuertemente que el valor de guía dado a estos productos es cuestionable (50).

Una de las principales debilidades en el proceso de cálculo de riesgo es la suposición que todos los congéneres de la toxina, en este caso MCs tienen las mismas propiedades toxicocinéticas y toxicodinámicas. Más de 80 diferentes congéneres de MCs se conocen hasta la fecha y lo más probable es que se descubrirán más en el futuro cercano. Sin embargo, los cálculos para evaluar el riesgo se basan en la propiedad toxicocinética y toxicodinámica de un solo congenero la MC-LR. La estimación del verdadero potencial tóxico se debe a que en las floraciones pueden presentarse simultáneamente múltiples congéneres de MCs. Los cálculos de riesgo se centran en la evaluación de la exposición un único compuesto, pero no, como en realidad ocurre en los actuales procedimientos empleados en la evaluación de riesgo para la salud humana, donde ocurren exposiciones simultáneas a varias toxinas de muy diferente estructura, cinética y dinámica, haciendo caso omiso de posibles efectos aditivos o incluso sinérgicos que pudieran presentarse.

La toxicidad de los SAVA es particularmente preocupante debido a que los beneficios del consumo de SAVA aún no están claros y no pudieron ser confirmados científicamente (51). Por ello, resulta problemático el valor guía provisional de MCs en SAVA de $1\mu\text{g MC-LR}/\text{equiv/g}$ de peso seco propuesto por el Departamento de Salud de Oregón, debido a la posibilidad de considerar los efectos aditivos o sinérgicos derivados de la presencia de otras toxinas de cianobacterias en casos donde existan floraciones, unido al consumo diario y voluntario de forma ilimitada del público en general y especialmente por los niños. Esta última situación es una gran preocupación porque los recientes análisis confirmaron la presencia de BMAA y MCs en estos productos SAVA, destacando claramente el alto potencial de la aparición de trastornos hepáticos, renal y neurológicos en niños.

BMAA se ha asociado con una mayor incidencia significativa de esclerosis lateral amiotrófica /Parkinson demencia compleja (ALS / PDC) en el pueblo chamorro en Guam y otras islas del Pacífico. Se demostró la bioacumulación en los distintos niveles tróficos de BMAA proviene de cianobacterias del género *Nostoc* en algunos de los alimentos tradicionales de estos habitantes de estas islas (52).

Cox y col (27) informaron que la producción de BMAA por las cianobacterias parece ser un fenómeno general, dado que BMAA se detectó en el 95% de los 21 géneros de cianobacterias. De hecho, la mayoría de los análisis realizados en SAVA de *A. flos-aquae* y *Spirulina* contienen grandes cantidades de BMAA lo cual ha sido demostrado mediante GC-MS/MS. Si el BMAA está implicado en la etiología de la enfermedad de ALS/PDC, los hallazgos de BMAA en SAVA podrían potencialmente explicar la detección de BMAA en los tejidos cerebrales de los canadienses con enfermedad de Alzheimer. Debería establecerse si estos pacientes habían consumido SAVA durante su vida.

A pesar que el BMAA no presenta una toxicidad muy alta, la acción tóxica de una floración de cianobacterias muy probablemente se deba a la toxicidad combinatoria de varias toxinas presentes. A pesar de ser muy complicado tener en cuentas estas cuestiones, las evaluaciones de riesgo deben considerar estas situaciones.

En general se reconoce que exposición a MCs en agua potable representa un riesgo significativo para la salud, sin embargo, la potencial de exposición de MCs puede ser sustancialmente mayor para los consumidores de productos SAVA. Esto es debido a que las floraciones de *M. aeruginosa* son eventos temporales siendo las concentraciones de MCs en la superficie de las aguas esporádicos, lo cual permite que las personas expuestas a MCs por el agua puedan recuperarse de alguna lesión hepática por los mecanismos naturales de depuración que el sistema hepático posee.

Sin embargo, los suplementos dietarios a base algas azul verdosas se cosechan durante la temporada de floración, se procesan y se distribuyen todo el año. Así, si el SAVA está contaminado con MCs, la exposición

a la toxina es continua durante todo el año. Además, la ingesta de toxinas de agua potable está naturalmente limitada por las tasas de consumo de agua (valor medio de 1.5 a 2 L/día), mientras que no hay prácticamente un límite a la cantidad de SAVA que pueda ser consumido. Los usuarios de estos productos admiten un consumo de hasta un 20 por g/día. Por lo tanto, el potencial de exposición a MCs en productos SAVA es mucho mayor que la exposición a través del agua potable.

Contrariamente a la situación de alimento o de agua, donde una limitación natural puede suponerse, el consumo diario de SAVA depende en gran medida de la persona (0.25-20 g) (18, 53). Por lo tanto, se puede suponer que la automedicación o la medicación a los niños por su padres con SAVA es un escenario distinto de exposición al cálculo de evaluación de riesgos tal como se prevé en el IPCS (1995) (54) que se refiere a la extrapolación de los riesgos de sustancias químicas para los seres humanos. De hecho, la absorción SAVA es una reminiscencia de la administración de compuestos terapéuticos y por lo tanto deben ser tratados de forma totalmente diferente a los referidos a alimentos o agua.

Es sabido que la contaminación de los productos SAVA se produce debido a la cosecha en un entorno abierto como un lago donde otras cianobacterias pueden crecer libremente; los SAVA comúnmente consumidos a base de *Spirulina* se producen bajo condiciones de cultivo, por ello, sería de esperar que la contaminación en los cultivos sería menos probable. Los resultados de las pruebas, mostrando bajos niveles de MCs en los productos de *Spirulina*, parecen apoyar esta conclusión. Sin embargo, aunque las condiciones de cultivo proporcionan la oportunidad para el mejor seguimiento y control cuidadoso de crecimiento de las algas tóxicas, no hay garantía que ocurra si no existe una estricta vigilancia y control. Sin estándares regulatorios claros para MCs y otros contaminantes potenciales, cualquier producto SAVA no puede considerarse como seguro.

Algunos productores de SAVA han realizado esfuerzos para reducir el contenido de MCs en sus productos. Un elemento clave para garantizar la seguridad es comprobar que el producto es adecuado y el lote está claramente caracterizado. La distribución de *M. aeruginosa* y la toxina MCs en lagos puede ser marcadamente variable, dependiendo de la estación y modificarse espacialmente. Los análisis han demostrado que los niveles MCs en estos productos varían mucho con el tiempo de cosecha. Por ejemplo, los SAVA cosechados durante los períodos de importantes florecimientos de *M. aeruginosa* contienen mayores niveles de toxinas, mientras que los niveles MCs en SAVA cosechados a finales del otoño son generalmente menores. Diversos análisis sugieren que la homogeneidad de los lotes no siempre ocurre lo cual enfatiza la necesidad de una adecuada caracterización de lote. En general, estos resultados indican que la contaminación con MCs encontrada en SAVA puede ser variable y debe ser regularmente monitoreada mediante pruebas exhaustivas y los lotes deben ser completamente homogéneos para garantizar la seguridad de los productos.

Vichi y col, (37), informaron una moderada variabilidad dentro del mismo lote, con escasas excepciones, indicando una posible composición no homogénea de cada lote. Por el contrario, la inter variabilidad del lote dentro de la misma marca fue muy alta (hasta 50 veces), incluso mayor que la comparación de los valores medios. Esto podría ser debido a diferencias en la ubicación y/o período de recolección relacionados con la presencia potencial de cianobacterias toxigénicas contaminantes en la producción de SAVA. De hecho, el análisis de muestras de floraciones ocurridas en Lago Klamath, empleando técnicas de biología molecular, indicó que el género *Microcystis* estaba presente en todas las muestras de algas conteniendo *A. flos-aquae*, fortaleciendo la hipótesis de que *M. aeruginosa* productora de MCs es la cianobacteria más común presente, cuya ocurrencia se ha observado con frecuencia en asociación con *A. flos-aquae* (7). La contaminación se ve favorecida por la estacionalidad de la floración de las cianobacterias: de hecho *A. flos-aquae* y *M. aeruginosa* comparten un período de floración de amplia superposición: la primera domina el fitoplancton de junio a octubre, mientras que la segunda aparece a menudo en julio y persiste hasta finales de otoño. Esta es la razón resulta importante a ser considerada la alerta acerca de una posible contaminación de los productos a base de *A. flos-aquae*.

Se ha informado que la contaminación con otras cianobacterias que puedan coexistir en productos algales derivados de *Spirulina* resulta ser menos frecuente, probablemente debido a los altos valores de pH (pH 9-10) requeridos para el crecimiento óptimo de *Spirulina* spp (19), lo cual podría inhibir el crecimiento de otras cianobacterias. Esta conclusión acuerda con los resultados informados por Vichi y col (37) pero no puede generalizarse, ya que variantes MC se han detectado en 34 de 36 muestras analizadas de productos algales basadas en *Spirulina* recogidos por diferentes productores comerciales en China (rango de 2-163 ng/g), con MC-RR como variante predominante (en 94.4% de las muestras), seguido de MC-LR (30.6%) y MC-YR (27.8%).

En Argentina resulta importante considerar los aportes de Arenas y Cortella (55) quienes analizaron el contenido de muestras comerciales de *Spirulina* (*Cyanophyta*), expandidas en el mercado local como suplementos dietéticos y adelgazantes. Se analizaron 4 muestras originarias de USA, Chile y Argentina. Las muestras fueron observadas al microscopio fotónico y al microscopio electrónico de barrido (MEB), previa liofilización. Los resultados mostraron que todas las muestras contenían *Spirulina platensis*. En algunas de ellas esta especie se presentó pura, mientras que en otras se encontró con otras como *Cyanophyta* (*Oscillatoria* y *Phormidium*) aproximadamente en las mismas proporciones. Los autores concluyen que la falta de un control de calidad combinado con insuficiente información en lo que respecta a la identificación y clasificación del material pudo haber contribuido a la contaminación mencionada. También indican que hallar las especies de *Oscillatoria* y *Phormidium* en productos destinados al consumo humano resulta peligroso ya que algunos de sus representantes suelen producir anatoxina-a una potente neurotoxina.

La presencia de taxones diferentes o componentes no mencionados en los rótulos encontrados en algunos suplementos dietéticos que contienen *Spirulina* (de procedencia nacional, Chile y Francia) representan adulteraciones de los productos analizados que puede deberse a que el inóculo del que parte el cultivo está constituido por más de una especie y el medio de cultivo utilizado resulta apropiado para que todas ellas desarrollen. Si el material proviene de una floración algal aun cuando la mayor parte de la biomasa pertenezca a especies de *Spirulina* podrían fácilmente encontrarse en el mismo hábitat organismos como *Oscillatoria* spp, y/o *Phormidium* spp los cuales presentan los mismos requerimientos para desarrollarse (56).

Pochettino y col. (57) analizaron suplementos dietéticos elaborados con algas adquiridos en las denominadas dietéticas de la ciudad de La Plata, Argentina. De 14 muestras etiquetadas como *Spirulina* aparece como no declarado *Diatomeas* O. Pennales, *Oscillatoria* aff. *subbrevis* Schmid.; *O. proboscidea* Gom, *O. chalybea* Mert., *Nitzschia pusilla* (Kütz.) Grunow.

La detección de las estirpes declaradas en los envases así como de las contaminantes tóxicas puede ser realizada empleando técnicas de biología molecular siendo una herramienta útil de información para los productores de SAVA que le permitiría planificar el tiempo de la cosecha, evitando la presencia de especies contaminantes tóxicas indeseables en particular cuando las algas verdes azules se recogen directamente del ambiente natural (58).

Varios autores han sugerido la necesidad aplicar estrictas normas de calidad de *Spirulina* (59, 60). Sin pruebas científicas, los usuarios no tienen forma fiable para detectar la presencia y/o concentración de toxinas.

6. Regulación

Productos SAVA y otros suplementos dietarios están regulados por la Food and Drugs Administration (FDA) de EE.UU en el marco de la Ley Suplementos dietarios de la Salud y Educación 1994 (DSHEA) (61). Bajo esta ley, los fabricantes de suplementos dietarios pueden comercializar sus productos sin tener que demostrar la seguridad del producto a la FDA.

La FDA no ha tomado una determinación sobre la seguridad del consumo de *S. platensis* referida a si es generalmente reconocido como seguro (GRAS por sus siglas en ingles). Sin embargo, la FDA "no tenía preguntas" en respuesta a la presentación como aditivo GRAS en la que un fabricante solicitaba que *Spirulina* sea utilizado como ingrediente en alimentos tales como bebida nutricional en polvo y como condimento en ensaladas y pastas en cantidades que oscilan de 0.5 a 3 g por porción (62)

Una sustancia GRAS es aquella cuya seguridad ha sido evaluados en términos de pruebas y procedimientos científicos realizaron por expertos cualificados y determina que es seguro bajo la condiciones de uso previsto (63).

Se desconoce los estándares de calidad de los productos. Tras la revisión el Comité de Expertos de Suplementos Dietarios (41), propone para *Spirulina* (*S. platensis* y *S. maxima*) especificaciones y métodos de prueba para los siguientes parámetros: descripción microscópica; límite de MCs (ensayada por método inmunológico no más de 1 ppm); metales pesados (no más de 10 mg/g); contenido de la proteína (no menos de 60%); y enumeración microbiana.

En la regulación Argentina la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) por Disposición 1637/2001 *Spirulina platensis* y *Spirulina máxima* Cianoficeae, alga entera, se encuentra en el listado positivo de hierbas y otros materiales de origen vegetal que podrán utilizarse como ingredientes en la composición de suplementos dietarios.

La disponibilidad en el mercado de un alto porcentaje de suplementos dietarios contaminados con MCs en niveles superiores al valor propuesto de 1 µg/g, junto con la alta variabilidad en los niveles de contaminación, incluso entre los lotes de la misma marca, las incertidumbres en el consumo diario de SAVA, y las consideraciones toxicológicas anteriormente informadas indican la posibilidad de presentarse riesgos para la salud humana según el nivel de contaminación. Se considera que debe apoyarse firmemente la necesidad realizar un seguimiento estricto de los productores de suplementos dietarios a base de SAVA controlando la contaminación de sus productos con MCs, así como una vigilancia rigurosa por la las autoridades de la Salud con el fin de asegurar una protección adecuada a los consumidores.

Claramente, como los SAVA no pueden ser completamente prohibidos en el mercado, una orientación más conservadora de los valores máximos para el contenido MCs y BBMA en estos productos así como una restricción para aplicación a los lactantes y niños sería aconsejable realizar si se prevén evitar problemas de salud a largo plazo (lesión hepática crónica y potencialmente neuropatías y nefropatías).

Por otra parte, la producción de suplementos dietéticos siempre presenta la posibilidad que el producto final pueda contener reconocidos patógenos para humanos como *Cryptosporidia*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* enteropatógena así como contaminado con considerable cantidades de MCs. Existe preocupación sobre la potencial contaminación de los productos SAVA con MCs incluidos los que contienen *Spirulina*. Por ello, un control estricto de las autoridades sanitarias sobre la calidad higiénico-sanitaria de estos productos, protegerá a los consumidores de efectos adversos agudos y crónicos que se puedan presentar y resulten de difícil diagnóstico.



Figura 1: *Spirulina platensis* en cultivo
(foto Leda Giannuzzi)

Referencias

1. Código Alimentario Argentino (CAA), http://www.anmat.gov.ar/Legislacion/Alimentos/Disposicion_ANMAT_1637-2001.pdf
2. Knubel G, Larsen LK, Moore RE, Levine IA, Patterson GM. Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue-green alga belonging to the Nostocaceae. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 1990; 43:1236–1239.
3. Rodriguez-Hernandez A, Ble-Castillo JL, Juarez-Oropeza MA, Diaz-Zagoya JC. *Spirulina maxima* prevents fatty liver formation in CD-1 male and female mice with experimental diabetes. *Life Sci*. 2001; 69:1029–1037.
4. Samuels R, Mani UV, Iyer UM, Nayak US. Hypocholesterolemic effect of spirulina in patients with hyperlipidemic nephrotic syndrome. *J. Med. Food*. 2002; 5:91–96.
5. Smith CD, Zhang X, Mooberry SL, Patterson GM, Moore RE. Cryptophycin: a new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells. *Cancer Res*. 1994; 54:3779–3784.
6. Linderman B. *Complicated Child Simple Options*. Romona, CA:Ransom Hill Press, 1995
7. Carmichael W, Drapeau C, Anderson D. Harvesting of *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Born & Flah var *flos-aquae* (Cyanobacteria) from Klamath Lake for human dietary use. *J. Appl. Phycol*. 2000; 12: 585–595.
8. Muhling M, Somerfield PJ, Harris N, Belay A, Whitton BA. Phenotypic analysis of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains (Cyanobacteria). *Phycologia* 2006; 45:148–157.
9. NCBI: National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. 2009; Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>.
10. Dillon JC, Phuc AP, Dubacq JP. Nutritional value of the algae *Spirulina*. *World Rev. Nutr. Diet*. 1995; 77: 32–46.
11. McGuffin M, Kartesz JT, Leung AY, Tucker AO. Editors. *Herbs of Commerce*, 2nd Edition. American Herbal Products Association. 2000; Silver Spring, MD
12. Ciferri O. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Rev*. 1983; 47: 551–578.
13. Wang J, Wang Y, Wang Z, Li L, Qin J, Lai W, Fu Y, Suter PM, Russell RM, Grusak MA, Tang G, Yin S. Vitamin A equivalence of spirulina β -carotene in Chinese adults as assessed by using a stable-isotope reference method. *Am. J. Clin. Nutr*. 2008; 87: 1730–1737.
14. Lumsden J. Hall DO. Soluble and membrane-bound superoxide dismutases in a blue-green algae (*Spirulina*) and spinach. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1974; 58: 35–41.
15. Otlles S, Pire R. Fatty acid composition of chlorella and spirulina microalgae species. *J. AOAC. Int*. 2001; 84: 1708–1714.
16. Tanaka M, Haniu M, Yasunobu KT, Rao KK, Hall DO. Modification of the automated sequence determination as applied to the sequence determination of the *Spirulina maxima* ferredoxin. *Biochem*. 1975; 14: 5535–5540.
17. Park HJ, Lee YJ, Ryu HK, Kim MH, Chung HW, Kim WY. A randomized double-blind, placebo-controlled study to establish the effects of spirulina in elderly Koreans. *Ann. Nutr. Metab*. 2008; 52: 322–328.
18. Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, Chu FS. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environ. Health Perspect*. 2000; 108: 435–439.
19. Saker ML, Jungblut AD, Neilan BA, Rawn DFK, Vasconcelos VM. Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. 2005; *Toxicon* 46: 555–562.
20. Salazar M, Chamorro G, Salazar S, Steele C. Effect of *Spirulina maxima* consumption on reproduction and peri- and postnatal development in rats. *Food Chem. Toxicol*. 1996; 34: 353–359.
21. Salazar M, Martinez E, Madrigal E, Ruiz EL, Chamorro GA. Subchronic toxicity study in mice fed *Spirulina maxima*. *J. Ethnopharmacol*. 1998; 62: 235–241.
22. Draisci R, Ferretti E, Palleschi L, Marchiafava C. Identification of anatox-ins in blue-green algae food supplements using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* 2001; 18 525–531.
23. Rapala J, Sivonen K, Luukkainen R, Niemelä S. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains — a laboratory study. *J. Appl. Phycol*. 1993; 5, 581–591.

24. Ferreira FMB, Soler JMF, Fidalgo ML, Fernandez-Vila P. PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma–Lever reservoir (Douro river, northern Portugal). *Toxicon* 2001; 39 757–761.
25. Mahmood NA, Carmichael WW. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon* 1986; 24 175–186.
26. Pereira P, Onodera H, Andrinolo D, Franca S, Araujo F, Lagos N, Oshima, Y. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* 2000; 38, 1689– 1702.
27. Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B. Diverse taxa of Cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; **102**: 5074–5078.
28. Maatouk I, Bouaicha N, Fontan D, Levi Y (2002) Seasonal variation of micro-cystin concentrations in the Saint–Caprais reservoir (France) and their re-moval in a small full–scale treatment plant. *Water Research*; 36: 2891–2897.
29. Ekman–Ekeboom M, Kauppi M, Sivonen K, Niemi M, Lepisto L. Toxic Cyanobacteria in some Finnish Lakes. *Environmental Toxicology & Water Quality*. 1992; 7: 201–213.
30. Teubner K, Feyerabend R, Henning M, Nicklisch A, Woitke P, Kohl JG. Alternative blooming of *Aphanizomenon flos-aquae* or *Planktothrix agardhii* induced by the timing of the critical nitrogen: Phosphorus ratio in hypertrophic riverine lakes. *Ergebnisse der Limnologie* 1999; 54: 325–344.
31. Sawyer PJ, Gentile JH, Sasner JJ Jr. Demonstration of a toxin from *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs. *Canadian Journal of Microbiology* 1968; 14 1199–1204.
32. Barica J. Collapses of *Aphanizomenon flos-aquae* blooms resulting in massive fish kills in eutrophic lakes: effect of weather. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie* 1978; 20: 208–213.
33. Sivonen K, Niemelä SI, Niemi RM, Lepistö L, Luoma TH, Räsänen LA. Toxic cyanobacteria (blue–green) algae in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia* 1990; 190: 267–275.
34. Hoeger SJ, Dietrich DR. Possible health risks arising from consumption of blue–green algae food supplements. 2004. In ICTC 6th, Bergen/Norway, pp 30,
35. Lawrence JF, Niedzwiedek B, Menard C, Lau BP, Lewis D, Kuper-Goodman T, Carbone S, Holmes C. Comparison of liquid chromatography/mass spectrometry, ELISA, and phosphatase assay for the determination of microcystins in blue-green algae products. *J. AOAC Int.* 2001;84:1035–1044.
36. Yu FY, Liu BH, Chou HN, Chu FS. Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50: 4176–4182.
37. Vichi S, Lavorini P, Funari E, Scardala S, Testai E. Contamination by Microcystis and microcystins of blue-green algae food supplements (BGAS) on the Italian market and possible risk for the exposed population. *Food Chem. Toxicol.* 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.029>.
38. Vinogradova T, Danaher M, Baxter A, Moloney M, Victory D, Haughley S. Rapid surface plasmon resonance immunobiosensor assay for microcystin toxins in blue-green algae food supplements. *Talanta*; 2011; 84: 638-643.
39. Iwasa M, Yamamoto M, Tanaka Y, Kaito M, Adachi Y. Spirulina-associated hepatotoxicity. *Am. J. Gastroenterol.* 2002; 97: 3212–3213.
40. Lee AN, Werth VP. Activation of autoimmunity following use of immunostimulatory herbal supplements. *Arch. Dermatol.* 2004;140:723–727.
41. Comité de Expertos de Suplementos Dietéticos (DSI-CE) Dietary Supplement Health and Education Act. Public Law 103-417, Section 13, 1994.
42. Heussner A H, Mazija L, Fastner J, Dietrich DR. Toxin content and cytotoxicity of algal dietary supplements. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2012; 265:263–271.
43. Braun L, Cohen M. *Herbs & Natural Supplements: An Evidence-based Guide*. Churchill Livingstone, 2010.
44. Mazokopakis E, Karefilakis C, Tsartsalis A, Milkas A, Ganotakis E. Acute rhabdomyolysis caused by Spirulina (*Arthrospira platensis*). *Phytomedicine* 2008; 15:525–527.
45. Petrus M, Culerrier R, Campistron M, Barre A, Rougé P. First case report of anaphylaxis to spirulin: identification of phycocyanin as responsible allergen. 2010; *Allergy* 65: 924–925.

46. Dourson ML, Felter SP, Robinson D. Evolution of sciencebased uncertainty factors in noncancer risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006; 24:108–120.
47. Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse. I: Microcystin-LR. *Human Exp Toxicol.* 1999; 18:162–167.
- 48 Health Canada (2008a). Blue green algae (Cyanobacteria) and their toxins. Internet: <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/cyanobactereng.php>
- Health Canada (2008b). Cyanobacterial Toxins: Microcystin-LR. Internet: http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/cyanobacterial_toxi
49. World Health Organization. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, *Monitoring, and Management.* Chorus, I. and Bartram, J., Eds., Internet: http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/toxiccyanbact/.
50. Dietrich D, Hoeger S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): Are reasonable or misguided approach? *Toxicol. Appl.Pharmacol.*2005; 203:273–289.
51. Vitale S, Miller NR, Mejico LJ, Perry JD, Medura M, Freitag SK, Girkin C. A randomized, placebo–controlled, crossover clinical trial of super blue–green algae in patients with essential blepharospasm or Meige syndrome. *American Journal of Ophthalmology* 2004; 138: 18–32.
52. Cox P, Banack S, Murch S. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Pro-ceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:13380–13383.
53. Schaeffer D, Malpas P, Barton L. Risk assessment of microcystin in dietary *Aphanizomenon flos-aquae*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*1999;44:73–80.
- 54.IPCS. Assessing human health risks of chemicals: derivation of guidance values for health-based exposure limits. *Environmental Health Criteria.* WHO, 1995, Geneva, pp. 1–74.
55. Arenas PM y Cortella AR. Análisis microscópico de muestras comerciales de Spirulina (Cyanophyta). *Acta Farm. Bonaerense.* 1996;15:11-19.
56. Arenas P. Relevamiento etnográfico, análisis micrográfico y potenciales efectos fisiológicos de suplementos dietéticos conteniendo algas en su composición. Tesis Doctoral, 2004.
57. Pochettino M L, Arenas P, Sánchez D, Correa R. Conocimiento botánico tradicional, circulación comercial y consumo de plantas medicinales en un área urbana de Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas,* 2008;7:141-148.
58. Saker ML, Welker M, Vasconcelos VM. Multiplex PCR for the detection of toxigenic cyanobacteria in dietary supplements produced for human consumption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 73: 1136–1142.
59. Rellan S, Osswald J, Saker M, Gago-Martinez A, Vasconcelos V. First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements containing Cyanobacteria. *Food Chem. Toxicol.* 2009;47:2189–2195.
- 60 Eisenbrand G. Microcystins in algae products used as food supplements. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008;52:735–736.
- 61.Dietary Supplement Health and Education Act. Public Law (DSHEA) 103-417, Section 13, 1994.
62. FDA.Agency Response Letter GRAS Notice No.GRN 000127. 2003. Internet: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153944.htm>.
63. FDA Redbook (2007). Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. Redbook 2000. Internet: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/Redbook/default.htm>