Farmacología y toxicología del alga *Spirulina*

*Germán Chamorro
*María Salazar
**Luis Favila
***Héctor Bourges

PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF THE ALGA *SPIRULINA*

Abstract

Spirulina, a unicelular filamentous blue-green alga has been consumed by man since ancient times in Mexico and central Africa. It is currently grown in many countries by synthetic methods. Initially the interest in *Spirulina* was on its nutritive value: it was found almost equal to other plant proteins. More recently, some preclinical testing suggests it has several therapeutic properties such as hypocholesterolemic, immunological, antiviral and antimutagenic. This has led to more detailed evaluations such as nucleic acid content and presence of toxic metals, biogenic toxines and organic chemicals: they have shown absence or presence at tolerable levels according to the recommendations of international regulatory agencies. In animal experiments for acute, subchronic and chronic toxicity, reproduction, mutagenicity, and teratogenicity the algae did not cause body or organ toxicity. In all instances, the *Spirulina* administered to the animals were at much higher amounts than those expected for human consumption. On the other hand there is scant information of the effects of the algae in humans. This area needs more research.

Keywords. *Antiviral, Hypocholesterolemic, Immune system, Nephrotoxicity, Antimutagenicity, Toxicology, Blue-green algae,* Spirulina.

Resumen

La *Spirulina*, alga azul-verde filamentosa unicelular, ha sido consumida desde tiempos remotos en México y Africa Central, en donde crece de manera seminatural o natural. Actualmente se cultiva en algunos países por métodos sintéticos. Hasta recientemente el interés en esta alga se centraba en su valor nutritivo que mostró ser casi igual al de proteínas de otras plantas. Sin embargo, algunos estudios preclínicos sugieren que también posee propiedades terapéuticas interesantes, tales como hipocolesterolemiante, inmunológica, antiviral y antimutagénica. Esto ha llevado a evaluaciones toxicológicas detalladas. El contenido de ácidos nucleicos y la presencia de metales, de aminas biogénicas y de compuestos químicos orgánicos, han sido negativos o están abajo de las concentraciones tolerables recomendadas por agencias internacionales de regulación de alimentos. Los experimentos en animales de toxicidad aguda, subcrónica, crónica, de reproducción, mutagenicidad y teratogenicidad, no han revelado ningún

Departamentos de:
* Toxicología y de
** Inmunología, Sección de Graduados, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
*** Departmento de Fisiología, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F.
Para correspondencia y solicitud de reimpresos dirigirse a: Dr. Germán Chamorro, Departamento de Toxicología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Apartado Postal 105-314, 11591 México, D.F.

Recibido el 9 de noviembre de 1995 y aceptado el 9 de mayo de 1996.

efecto adverso del alga, y en todos los casos, la cantidad de *Spirulina* administrada a los animales fueron iguales o superiores al consumo humano. Sin embargo, hay pocos estudios de los efectos de consumo de *Spirulina* en humanos. Esta área necesita más estudios.

Palabras clave. *Antiviral, Hipocolesterolemiante, Sistema inmune, Nefrotoxicidad, Antimutagenicidad, Toxicología, Alga azul-verde,* Spirulina.

Introducción

Algunas levaduras, bacterias y algas, pueden constituir una alternativa interesante en la alimentación por ser fuentes importantes de proteínas, vitaminas y minerales.[1]

Entre las algas consideradas con posible potencial para consumo humano, se han estudiado algunas especies de los géneros *Chlorella, Scenedesmus, Coelastrum* y *Spirulina.*[2] De éstas, la *Spirulina* parece ser el microorganismo más prometedor por su alto contenido de proteína bruta (60-71%)[3,4] y su patrón de aminoácidos razonablemente bueno aunque, dependiendo de su origen, algunas especies son deficientes en aminoácidos azufrados y lisina.[5] Sin embargo, la eficiencia y utilización proteica neta, el valor biológico y la digestibilidad de la *Spirulina,* aunque inferiores a los de la caseína, son comparables o mejores que las proteínas convencionales de la mayoría de las plantas.[6] La *Spirulina* es una fuente importante de vitaminas (especialmente vitamina B12 y carotenos), minerales (hierro) y ácido gama-linoleico.[7] Estas ventajas, además de su cultivo relativamente fácil, condujeron a la producción seminatural en el lago de Texcoco, y más tarde a cultivos artificiales en Israel, Taiwan, Tailandia, Estados Unidos y otros países.[8] En algunos lagos naturales es de los microorganismos más comunes y abundantes, y representa casi la totalidad de biomasa del fitoplanton.[9]

Algunas algas consideradas para la alimentación, como clorofitas y bangiofitas, han demostrado poseer tanto efectos terapéuticos en el tratamiento del bocio,[10] así como la capacidad de producir reacciones alérgicas, desórdenes gastrointestinales, disminución de leucocitos en humanos, y muerte de ganado, aves y otros vertebrados, como es el caso de algunas algas verde-azules.[11] En consecuencia, la *Spirulina,* se ha sometido a detallados estudios farmacológicos y pruebas toxicológicas a corto y largo plazo, siguiendo los lineamientos internacionales,[12,13] cuya revisión y análisis es el objetivo del presente trabajo.

Experimentos farmacológicos

Efecto hipocolesterolemiante y disminución de peso

El primer trabajo sobre reducción de la concentración de colesterol en el suero con *Spirulina* corresponde a Anusuya-Devi y Venkataraman,[14] quienes encontraron que la incorporación al 15% en la dieta de ratas durante 4 semanas, reduce 14% su colesterolemia. Posteriormente Kato et al,[15] describieron en el mismo tipo de animales, descensos del colesterol total, colesterol de lipoproteínas de baja densidad y fosfolípidos, por ingestión de dietas que contenían 16% de *Spirulina.* También Iwata et al,[16] al alimentar con 5, 10 y 15% del alga a ratas en las que se había producido hiperlipidemia mediante la administración de fructosa, observaron que disminuye tanto el colesterol de lipoproteínas de alta densidad, como los triglicéridos y fosfolípidos. Por su parte, González de Rivera et al,[17] utilizando el mismo modelo animal, demostraron que administrando dietas con 5% de *Spirulina,* se redujeron 28% el colesterol del plasma y 60% los triglicéridos del hígado; sin embargo, la concentración de fosfolípidos en este órgano aumentó 35%. Nakaya et al[18] señalaron que la *Spirulina* administrada a voluntarios con hiperlipidemia e hipertensión, a dosis de 4.2 g/día, reduce significativamente el colesterol de lipoproteínas de baja densidad a las 4 y 8 semanas de tratamiento, con lo que declina también el índice aterogénico. Becker et al,[19] en un estudio cruzado doble ciego efectuado con pacientes obesos que consumen 2.8 g, tres veces al día durante 4 semanas como dieta suplementaria, observan que el alga reduce ligera, pero significativamente el peso corporal, sin notarse alteraciones clínicas ni bioquímicas.

Cáncer y sistema inmune

Richmond[20] cita a Lijima quien describe que la ficocianina, pigmento azul que constituye el 15% del alga, administrada a ratones inyectados con células

tumorales hepáticas, aumentaron su tiempo de sobrevida en relación a testigos, y hay un incremento en ellos de actividad linfocítica. Por otra parte Schwartz et al,[21] con extractos de *Spirulina* y *Dunaliella,* ricos en beta caroteno, previenen el desarrollo de tumores bucales en hámster, posiblemente por estimulación de la respuesta inmune, para destruir selectivamente pequeños focos de células malignas.

Nagao et al[22] informan además de la inhibición de la hipersensibilidad de tipo tardío producida por el tolueno-2, 4-diisocianato, en ratones a los que se les proporciona durante 5 semanas una dieta que contiene *Spirulina.*

Propiedades antivirales

Recientemente Hayashi et al[23] muestran que los extractos acuosos de *Spirulina* inhiben la replicación del virus Herpes simplex tipo 1 en células HeLa. Este extracto no presenta actividad virucida y no interfiere con la adsorción viral a las células HeLa, aunque sí afecta su penetración. A una concentración de 1 mg/mL se produce una inhibición específica de la síntesis de proteínas virales, sin supresión de la síntesis proteica de las células huésped. En el estudio *in vivo* con hámsters infectados, a los que se proporciona alimento con el extracto, se prolonga su tiempo de vida.

Por otra parte, un trabajo reciente del National Cancer Institute en Estados Unidos, revela que algunos extractos de cianobacterias que contienen sulfolípidos (particularmente *Lyngbya lagerheimii* cepa DN-7-1, y *Phormidium tenue* cepa CN-2-1), protegen a células T linfoblastoides humanas, del efecto citopático causado por la infección con el virus humano de la inmunodeficiencia adquirida (VHI-1).[24] Un análisis reciente muestra que la *Spirulina* contiene aproximadamente 1% de sulfolípidos en base seca.[7] Sin embargo, hasta el presente, no se han realizado estudios al respecto con esta alga.

Efectos antimutagénicos

En años recientes se han estudiado intensamente las capacidades antimutagénica y radioprotectora de extractos de plantas y animales. En este aspecto, los extractos alcohólicos de *Spirulina* reducen significativamente las frecuencias de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón tratados con radiaciones gama: el efecto se observa dando la *Spirulina* antes o después de la radiación.[25]

Otras propiedades

Se han advertido en la literatura otras propiedades terapéuticas de los componentes de *Spirulina* como la ficocianina, que previene la nefrotoxicidad del mercurio inorgánico y cisplatino en ratas.[26] Además, restablece la actividad colinesterásica inhibida por plaguicidas órganoclorados en eritrocitos humanos.[27] Asimismo, se le atribuyen propiedades hipoglucemiantes[28] y antihipertensivas.[29]

Estudios toxicológicos

Acidos nucleicos

El incremento en la ingestión de ácido ribonucleico y ácido desoxirribonucleico aumenta la concentración de ácido úrico en sangre y eleva el riesgo de gota. A su vez, la excreción elevada de ácido úrico afecta el riñón produciéndose calculosis y cristaluria.[30] Esto se debe a la incapacidad del sistema enzimático humano para metabolizar las purinas más allá del ácido úrico, lo que representa una de las limitantes para el consumo de microorganismos como fuente de alimentación.

Los ácidos nucleicos representan aproximadamente el 4 al 6% de peso seco en las algas, el 8 al 12% en las levaduras, y el 20% en las bacterias.[31] En la *Spirulina,* de acuerdo al estudio de Jassey,[32] se encontró 4.3% de ácidos nucleicos totales.

Metales pesados

La contaminación de las algas con metales pesados ha sido uno de los mayores problemas a resolverse, ya que los acumulan a concentraciones a veces superiores a las del medio ambiente.[31] Entre los metales nocivos encontrados con mayor frecuencia están plomo, cadmio, mercurio y arsénico, que requieren especial atención por sus efectos sobre la salud.

Las concentraciones permisibles de metales en proteínas celulares, según recomendaciones emitidas en 1972 por la IUPAC,[12] son de 5 mg/kg para plomo, 1 mg/kg para cadmio y 0.1 mg/kg para mercurio. En la actualidad se han emitido otras normas a nivel internacional[33] pero se refieren más bien a cantidades máximas de metales que el hombre puede ingerir en

sus alimentos sin riesgo. Los análisis de metales (arsénico incluido) efectuados con *Spirulina,* difieren entre laboratorios por varias causas (método de análisis, muestra del alga, técnicas de cultivo y periodo de recolección).

En la tabla 1 se observa que en las muestras de *Spirulina* cultivada en México y en el lago Chad hay concentraciones de mercurio más altas a las recomendadas por la IUPAC. Asimismo, en una de las muestras mexicanas se exceden los niveles de plomo y arsénico aunque en menor proporción. Aparentemente, la *Spirulina* cultivada en la India no sobrepasó ninguna de las concentraciones de los elementos considerados. Las principales razones para encontrar valores altos de metales son el uso de fertilizantes, la contaminación del agua y de la atmósfera.

Toxinas biogénicas

Los análisis químicos y bioquímicos de *Spirulina* no han detectado ficotoxinas, micotoxinas o toxinas bacterianas.[6] No se encontraron ocratoxina A, citrinina, patulina, ácido penicílico, aflatoxina, zearalenona, tricoteceno ni sterigmatocistina. La alimentación de animales con el fin de detectar algún defecto específico de toxinas, tampoco reveló síntomas de alguna intoxicación.[31]

Compuestos orgánicos

Otro grupo importante de contaminantes ambientales que pueden estar presente en las algas son los bifenilos policlorados e hidrocarburos aromáticos policíclicos.[31] Los hidrocarburos constituyen cerca de la mitad de la fracción insaponificable de la *Spirulina,* siendo el n-heptadecano el constituyente mayor (65%).[34] Los análisis de dialquilnitrosaminas, nitrosopiperidina, nitrosomorfolina y nitrosopirrolidina en *Spirulina* han sido negativos,[31] y los análisis de plaguicidas como paratión, malatión, endrín, aldrín y dieldrín, p, p'DDE, p,p'DDT aparecen únicamente como huellas.[35]

Tabla 1. Partes por millón de plomo, cadmio, mercurio y arsénico en Spirulina.

	Pb	Cd	Hg	As	Año de análisis
Proteínas unicelulares	5.0	1.0	0.1	2.0	–
Spirulina México	5.1	0.5	0.5	2.9	1975
Spirulina Chad	3.7	–	0.5	1.8	1975
Spirulina México	1.9	0.05	0.2	0.9	1976
Spirulina México	0.5	–	–	2.4	1977
Spirulina México	0.4	0.1	0.2	1.1	1982
Spirulina India	4.0	0.6	0.1	1.0	1982

Modificada de Refs 31 y 12.

Toxicidad aguda

La toxicidad aguda, entre otros propósitos, establece la dosis máxima sin efecto aparente y predice lo que puede suceder en el hombre por una sobredosificación.[36]

La administración oral de una suspensión de *Spirulina* a ratas Wistar, hasta dosis de 800 mg/kg, no produce muertes, síntomas tóxicos, ni alteración en el consumo de alimento durante dos semanas de observación. La autopsia tampoco acusa alteración en el peso e histología de los órganos.[37] En una exhaustiva revisión de la literatura, no encontramos más datos en relación a la toxicidad aguda.

Toxicidad subcrónica

La toxicología subcrónica investiga los posibles efectos acumulativos causados por los agentes químicos sobre los tejidos o sistemas metabólicos.[38] En experimentos en donde el alga *Spirulina* se proporciona a grupos de ratas Wistar recién destetadas durante 13 semanas a concentraciones de 10, 20 y 30%,[39,40] se observa una ligera disminución en la cantidad de alimento consumido y consecuentemente en el peso corporal. No se observan efectos en la citología hemática, orina, química sanguínea ni histología. Aunque hay algunas diferencias con los testigos en el peso de la vesícula seminal y del bazo de las hembras, fueron casos aislados (tabla 2): no hay una relación dosis respuesta, por lo que no tiene significado toxicológico. Por otra parte, dos dietas conteniendo 26 y 73 g/100 g de *Spirulina* proporcionadas a ratas durante 100 días no causaron alteraciones macroscópicas o microscópicas en los órganos.[41]

La alimentación de ratas recién destetadas, durante 2 y 4 meses, con raciones en las que el 60% de la proteína es *Spirulina,* aumenta los pesos de riñón, corazón y pulmones, así como el síndrome de nefrocalcinosis en las hembras de todos los grupos.[42]

En ratas Sprague-Dawley machos de 13 semanas, Contreras et al,[43] después de una dieta de 25 días con *Spirulina* como única fuente de proteínas tampoco encontraron alteraciones. La cuantificación de las hormonas gonodotrófica, luteinizante, folículo estimulante y prolactina, fueron normales.

Yap et al[44] reemplazaron con *Spirulina* hasta el 33% de la proteína de soya proporcionada a lechones de 4 a 8 días de edad. Las células hepáticas de algunos lechones presentan acumulación de bilis e infiltración de grasa; pero no hay lesiones histológicas de tracto gastrointestinal, riñones y suprarrenales. En otro experimento, la alimentación con *Spirulina* de la trucha arcoiris *(Salmo gairdnecii)* a la concentración de 40% por períodos superiores a 10 semanas, no origina alteraciones histopatológicas.[45]

Toxicología crónica

La toxicidad crónica establece la naturaleza de la toxicidad del compuesto y además busca si se manifiesta toxicidad después de exposición prolongada.[36]

En un estudio con *Spirulina* dada a ratas macho y hembra a la concentración de 25% durante 75 semanas, no se observan alteraciones en el comportamiento, crecimiento ponderal ni histopatología de algunos órganos.[46]

Yoshino et al,[47] en un estudio de toxicidad crónica de 6 meses en el que se suministran *Spirulina* a ratas macho y hembra a concentraciones de 62 y 34% en la dieta. Aunque observan algunas diferencias estadísticas en los valores hematológicos tales como concentración de hemoglobina y alanino-aminopeptidasa en los machos, y de bilirrubina total en hembras, no se detectan daños posteriores.

Chamorro et al[48] tratan grupos de ratas Wistar de 20 machos y 20 hembras durante 84 semanas con *Spirulina* incorporada al alimento a las concentraciones de 10, 20 y 30%: la evolución ponderal de los animales tratados fue la misma que las de los animales testigo que recibieron soya. Las pruebas bioquímicas, hematológicas y el análisis de la orina a los 48, 64 y 80 semanas, no muestran diferencias significativas entre grupos. El examen macro y microscópico de los órganos revela únicamente alteraciones propias de la edad de los animales, y por lo tanto es igual a los testigos.

Toxicología de la reproducción

Los estudios sobre toxicología de la reproducción establecen los efectos sobre la fertilidad y reproducción, desarrollo del embrión, lactación y desarrollo del recién nacido.[49]

a) Teratogénesis

Aunque de acuerdo a las instancias internacionales, se recomienda realizar estos estudios con las proteínas unicelulares,[50] para

Tabla 2. Peso relativo (% del peso corporal) de algunos órganos de ratas alimentadas con *Spirulina* durante 13 semanas.

Spirulina en dieta	Peso corporal (g)	Cerebro %	Riñón %	Hígado %	Bazo %	Supra-rrenales %	Testículo/ ovarios %	Vesícula seminal %
				Machos				
Testigo	346	0.48	0.79	3.41	0.18	0.02	0.90	0.32
20%	340	0.49	0.77	3.32	0.19	0.02	0.88	0.39*
30%	335	0.46	0.83	3.50	0.17	0.02	0.84	0.42*
				Hembras				
Testigo	206	0.71	0.83	3.20	0.17	0.03	0.03	–
20%	203	0.73	0.74	3.13	0.21*	0.03	0.03	–
30%	202	0.71	0.81	3.33	0.18	0.02	0.03	–

Modificada de Ref 39.
*Diferencia significativa ($p < 0.05$) vs grupo testigo (prueba t).

Spirulina se encuentran en la literatura únicamente los trabajos de Chamorro et al.[51-53] En todos sus experimentos utilizan concentraciones de *Spirulina* de 10, 20 y 30%. En el caso del hámster, el alga se administra en los días 7 a 11, 1 a 11 y 1 a 14 de la gestación; en la rata, los días 7 a 14, 1 a 14 y 1 a 21, y en el ratón, los días 7 a 13, 1 a 13 y 1 a 19. En ninguno de los experimentos se produce nacimiento de fetos deformes, reabsorciones embrionarias o disminución del peso al nacer.

b) Estudios peri- y postnatales

Recientemente se publicaron los resultados sobre la posible toxicidad peri y postnatal de la *Spirulina*, administrada a machos por 9 semanas previas al acoplamiento, y a hembras 2 semanas antes, en la gestación y antes del destete de las crías.[54] El tratamiento no ocasiona efectos adversos sobre la fertilidad, la duración de la gestación ni sobre diferentes indicadores del desarrollo de los neonatos.

c) Estudios multigeneracionales

La *Spirulina* proporcionada en concentraciones de 10, 20 y 30% a ratas en estudio multigeneracional (tres generaciones), se vigilaron los índices de fertilidad, gestación viabilidad y lactación. En la generación F_3b se hace además un estudio de toxicidad subcrónica: no se encuentra alteración en ninguna de las variables consideradas.[55]

La administración de *Spirulina* como única fuente de proteínas desde el destete hasta la segunda semana de lactación, tampoco afecta los parámetros reproductivos,[56] ni altera el desarrollo peri-post-natal.[42]

c) Mutagénesis

La posible actividad mutagénica de *Spirulina* es estudiada por Chamorro y Salazar,[57] administrando el alga durante cinco días o durante 10 semanas a ratones macho, a concentraciones de 10, 20 y 30% en dieta experimental. Posteriormente los machos son apareados con hembras vírgenes no tratadas, dos diferentes cada semana. El examen de útero y ovarios de las hembras gestantes en los días 12 o 14 no revela pérdidas pre ni post-implantación, por lo que la *Spirulina* no ocasiona aumento en la frecuencia de genes dominantes letales. En otros experimentos realizados en ratas tampoco se advierte ese tipo de efectos después de cinco días[58] y de 10 semanas de administración del alga.[59] Los resultados son igualmente negativos en la prueba de Ames cuando la orina de ratas tratadas con *Spirulina* durante cuatro meses, se aplica en *Salmonella thyphimurium* y *Schizosaccharamyces pombe*.[42]

Toxicología en seres humanos

Unicamente encontramos dos trabajos en humanos relativos a aspectos toxicológicos. En el estudio realizado por Becker y cols[19] con el objeto de investigar el efecto del alga sobre la obesidad, no se observan alteraciones de la presión sanguínea, de la bioquímica sérica ni de la citología hemática (el alga fue administrada cuatro semanas a obesos jóvenes a dosis de 2.8 g tres veces al día, como dieta suplementaria). En otro trabajo, Becker,[60] sin dar detalles de dosis, tipo de población ni análisis químicos previos, comenta resultados contradictorios. Así, indica la ausencia de efectos fisiológicos, pero habla de malestar, vómito e indigestión en sus casos. Sin embargo, los problemas gastrointestinales detectados pueden haber estado relacionados más bien con contaminantes bacterianos que con toxinas.[5]

Discusión

En la literatura existen publicaciones sobre las propiedades antivirales, antibióticas, antifúngicas, antitumorales, antihelmínticas, antihipertensivas, anticoagulantes, antiinflamatorias, analgésicas y de efectos sobre sistema nervioso central de algunas algas marinas;[61-68] no existe, en cambio, evidencia rigurosa para establecer los efectos terapéuticos de las microalgas dulce-acuícolas. Sin embargo, lo escaso de la información no excluye la posibilidad de que algunas de ellas pudieran poseer actividades farmacológicas interesantes.

De las propiedades farmacológicas atribuídas a la *Spirulina*, la actividad hipocolesterolemiante ha sido la más estudiada en animales. Un primer experimento en humanos muestra también que el alga tiene esta actividad.[18] Se sabe que algunos constituyentes dietéticos, grasas, proteínas, carbohidratos y fibra, influyen en las concentraciones plasmáticas de colesterol. Sin

embargo, esos constituyentes difieren en los alimentos y así su efecto no puede ser generalizado.[14] Los agentes hipocolesterolemiantes pueden ejercer su acción por interferir con la síntesis, transporte o metabolismo de las lipoproteínas, con la absorción intestinal de colesterol, o modificando la síntesis hepática de la HMGCoA-reductasa.[69,70] Otras algas como *Scenedesmus*,[14,71-73] también disminuyen el colesterol plasmático en diferentes animales de laboratorio. En el caso de *Scenedesmus*, se ha atribuído su acción hipocolesterolemiante al aumento de la excreción fecal del colesterol y otros productos,[74] siendo determinante para este efecto la calidad y la cantidad de proteínas.[14] El decremento en la concentración de colesterol en suero e hígado de sujetos bajo dietas con *Spirulina* se debe probablemente a este mismo mecanismo, aunque Klausner[75] lo atribuye al ácido eicosapentanoico, ácido graso poliinsaturado presente en el alga, y que actuaría por un mecanismo diferente. Por otra parte, la reducción del colesterol y el aumento en los fosfolípidos séricos indican que la *Spirulina* contiene un factor o factores que pueden prevenir las alteraciones del metabolismo de los triglicéridos provocados por la fructosa.[17] Para conocer el agente responsable del efecto, es necesario realizar estudios biodirigidos a partir de los extractos del alga. La pérdida de peso causada por la administración suplementaria de *Spirulina* a pacientes obesos, muestra la influencia del alga para producir este efecto[19] aunque los autores no discuten el posible mecanismo de acción. Al respecto, es necesario efectuar estudios más elaborados y confirmativos en animales de laboratorio. Los principios activos de algunas algas azul-verdes han mostrado actividad en leucemias linfocíticas y en varios tipos de tumores.[11,62,76-78] Sin embargo, en el caso de la *Spirulina*, los datos experimentales deben ser analizados más cuidadosamente y ampliarse los estudios a modelos más específicos.

Entre los factores que se cree juegan un papel importante en la carcinogénesis, se encuentran implicados los radicales libres: éstos pueden no sólo atacar el ácido desoxirribonucleico, sino también a proteínas estructurales, enzimas y membranas celulares. El sistema de defensa contra los radicales depende mucho de vitaminas antioxidantes, carotenoides (beta-caroteno) y otros nutrimentos. La *Spirulina* tiene un alto contenido de beta-carotenos (cis y trans)[79,80] que podría contribuir a la disminución de riesgo del cáncer mientras sea ingerida en cantidad suficiente y por tiempo prolongado.[20,81]

En el caso de las propiedades contra el virus Herpes, algunos estudios han descrito la actividad de substancias obtenidas de vegetales, como taninos,[82] glicoalcaloides,[83] saponinas[84,85] y de diversos extractos.[86-88] La acción antiviral de los extractos puede deberse a la inhibición de la penetración de los virus en las células. Algunas substancias interfieren con los eventos tempranos de esta penetración. Se ha sugerido que ella puede ser un evento múltiple que involucre a más de una proteína viral, por lo que es interesante estudiar la interacción entre el extracto de *Spirulina* y las glicoproteínas virales.[23] Estos datos sugieren que los extractos del alga contienen componentes que pueden ser utilizados efectivamente como agentes antivirales. Los análisis subsiguientes de los mismos, incluyendo purificación y caracterización química, permitirán identificar fármacos con actividad específica. Como agentes con actividad potencial contra el virus VIH se ha informado en la literatura de polisacáridos obtenidos de plantas,[89] derivados de lignina,[90] y ácidos tetragaloilquinolínicos,[91] implicados en su mayor parte como inhibidores de la transcriptasa inversa.[92] Los sulfolípidos encontrados en cianobacterias representan una nueva estructura con utilidad potencial no descrita anteriormente como inhibidora de VIH-1. Actualmente tiene una alta prioridad para investigaciones y evaluaciones clínicas[24] que, por lo delicado del problema, requieren realizarse con el mayor cuidado.

Los estudios de antimutagenicidad muestran que el extracto de *Spirulina* posee dicha actividad, no siendo el alga por sí misma genotóxica.[57,58] Dicho resultado puede deberse a que algún componente del alga tiene la capacidad para reparar el daño inducido por las radiaciones ionizantes o para aumentar la actividad del radical en las células irradiadas, produciendo estabilidad en el ácido desoxirribonucleico. El efecto protector de los extractos alcohólicos del alga contra las radiaciones parece sumarse al efecto antimutagénico de principios activos de substancias de otros vegetales. Se trata de flavonoides, carotenoides y saponósidos,[93] de los que el verdadero mecanismo no se ha podido establecer.[94,95]

De acuerdo con ciertos autores,[96] algunas de las otras propiedades farmacológicas de la *Spirulina* podrían estar relacionadas con la presencia de altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, pertenecientes a las series n-6, principalmente el ácido linoleico 18:2n-6 y el gama-linolénico 18:3n-6. Se sabe que el ácido gama-linolénico, el cual en seres humanos es sintetizado a partir de ácido linoleico, se requiere para síntesis de ácido araquidónico y de prostaglandinas. A su vez, la prostaglandina E_1 (PGE_1) está involucrada en muchos procesos, como la regulación de la presión sanguínea, la síntesis de colesterol, y la inflamación y proliferación celulares.[20] Es difícil asegurar, sin embargo, que algunas de las propiedades atribuídas a la *Spirulina* se deban a este ácido, ya que las cantidades que se pudiesen haber administrado en los experimentos mencionados son demasiado reducidas para ejercer tales efectos.

El Protein-Calory Advisory Group[13] recomendó que el consumo de ácidos nucleicos no debe exceder de dos gramos a partir de cualquier fuente no convencional, así como de 4 g totales al día. Así, es recomendable una máxima ingestión de 30 g de alga por día, aunque Bourges y cols,[41] calculan que se podrían consumir 46 g en adultos sin ocasionar problemas. Desafortunadamente, las pruebas clínicas llevadas a cabo en seres humanos aportan pocos datos que impiden definir el valor límite para lograr una concentración segura en el suero.[97] Al momento, la *Spirulina* no parece representar un peligro en lo que se refiere a su contenido de ácidos nucleicos para consumo diario de niños y adultos. Esto se ha confirmado también para otras algas como *Scenedesmus*[98,99] y *Chlorella*.[100]

Los estudios de concentración de metales indican que la *Spirulina* no excede, en términos generales, los límites recomendados por las agencias internacionales. Sin embargo, como en cualquier proceso de control de calidad, son indispensables las revisiones periódicas de concentración de metales, particularmente por el aumento de metales en el medio ambiente por las actividades cotidianas e industriales. Yannai y cols[101] mencionan que la acumulación de metales en las algas constituye un problema de toxicidad secundaria al pasar a los tejidos de los animales, y su consumo subsiguiente por el humano y otras especies. Sin embargo, en el caso de las algas, no se ha detectado acumulación de este tipo, debido posiblemente a la abundante cantidad de fosfatos que, al formar sales insolubles con metales, no se absorben en el tracto gastrointestinal.[31] Estos estudios se han efectuado por ejemplo con *Micractinius*, sin encontrarse efectos nocivos.[102] Suponiendo un consumo diario de 30 g de alga y que la ingestión de metales pesados a través de éstas y de otros productos incluyendo los líquidos es de 50%, se puede permitir en las algas hasta una concentración de 7.1 ppm de plomo, 1.2 ppm de cadmio y 0.7 ppm de mercurio.[103]

La ausencia de ficotoxinas en *Spirulina* constituye una ventaja sobre algas como *Microcystics*, *Anabaena* y *Afanizomenon*, cianobacterias de aguas dulces que han producido muerte en el ganado, y que pueden causar reacciones alérgicas o gastrointestinales en seres humanos.[31] En lo que concierne a la toxicidad aguda, no se ha podido determinar la dosis letal cincuenta (DL_{50}) debido a que, tratándose de un alimento, habría que proporcionar cantidades grandes en administración única, lo que técnicamente no es posible, v.gr. una dosis de 800 mg/kg usado en ratas[37] significa un consumo relativo de 48 g de *Spirulina* por el hombre con peso promedio de 60 kg. Aunque se supone que este consumo o cercano a él, son sobrepasados en la preparación de quesos y pastas en México y Chad,[104] así como en algunas prácticas actuales (Durand-Chastel, comunicación personal), deben tomarse ciertas cautelas para consumir dosis súbitas elevadas. Por otra parte, los estudios de toxicidad subcrónica y crónica con *Spirulina*, no revelan efecto tóxico. En tanto los resultados en animales de laboratorio permitan hacer la extrapolación al hombre, se anticipa que el alga no ocasionaría efectos indeseables si fuese consumida inclusive durante toda la vida. Según estudios de este tipo llevados a cabo con *Scenedesmus*, a concentraciones similares en la dieta, tampoco se afectaron los parámetros bioquímicos y hematológicos; sin embargo, sí se produjo infiltración grasa en hígado por falta de disponibilidad proteica del alga.[2]

La ausencia de efectos nocivos en lo correspondiente a fertilidad, proceso reproductivo, teratogenicidad y período peri-postnatal, señalan también la relativa seguridad para consumo del alga en el período de vida sexual activa del hombre y la mujer, así como también en el período de gestación. Asimismo, se descartan algunos riesgos en lo que respecta al consumo de *Spirulina* a través

de generaciones sucesivas. Resultados un tanto diferentes se observan con la administración de *Scenedesmus* a ratones, que redujo 11% el tamaño de la camada[105] y su crecimiento.[31] La mayoría de los efectos terapéuticos de la *Spirulina* han sido estudiados en animales de laboratorio y pocos en seres humanos[7] por lo que deben realizarse en mayor número en estos últimos, encaminados a la detección de efectos ya confirmados en la experimentación preclínica.

En lo que se refiere a la toxicología, las tres décadas de estudios experimentales muestran que el alga está exenta de efectos indeseables administrada a animales en concentraciones que superan en mucho el posible consumo humano. Sin embargo, la información disponible con respecto a efectos posibles en éstos es también muy escasa, por lo que existe igualmente la necesidad de llevar a cabo estudios prolongados y sistemáticos, independientemente de que el consumo del alga sea ancestral.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la señorita Alejandra Romero S. por el trabajo mecanográfico de este artículo.

Referencias

1. Becker EW. Comparative toxicological studies with algae in India, Thailand and Peru. In: Shelef G, Soeder CJ (eds). Algal biomass. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980:767-86.
2. Venkataraman LV, Becker WE, Khanum PM, Mathew KR. Short term feeding of alga *Scenedesmus acutus* by different methods growth pattern and histopathological studies. Nutr Rep Int 1977; 16:231-40.
3. Paoletti C, Vincenzini M, Bocci F, Materassi R. Composizione biochimica generale delle biomasse di *Spirulina platensis* e S. *maxima*. In: Materassi R (ed) Atti del convegno. Prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia. Firenze: Accademia dei Georgofili, 1980:111-25.
4. Tranquille N, Emers JJ, de Chambure D, Binot R, Tamponnet C. Spirulina acceptability trials in rats. A study for the "Melissa" life support system. Adv Space Res 1994; 14:167-70.
5. Dillon JC, Phan PA. *Spirulina* as a source of proteins in human nutrition. Bull Inst Ocean 1993; 12:103-7.
6. Becker EW. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. Biomass 1984; 4:105-25.
7. Belay A, Ota Y, Miyakowa K, Shimamatsu H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. J Appl Phycol 1993; 5:235-41.
8. Johnson PE, Shubert LE. Accumulation of mercury and other elements by *Spirulina* (Cyanophyceae). Nutr Rep Int 1986; 34:1063-72.
9. Lemoine Y, Dang DK, Phan PA, Zabulon G, Thomas JC. In fluence of salinity on the growth rates and onpigment and protein contents of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis*. Bull Inst Ocean 1993; 12:77-87 .
10. Barton LL, Foster EW, Johnson GV. Viability changes in human neutrophils and monocytes following exposure to toxin extracted from Aphanizomenon flos-aquae. Can J Microbiol 1980; 26:272-4 .
11. Stein JR, Borden CA. Causative and benefical algae in human disease conditions: a review. Phycologia 1984; 23:485-501 .
12. IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry. Proposed guidelines for testing of single cell protein destined as major protein source for animal feed. Technical Report 12. Oxford: IUPAC Secretariat, 1974.
13. PAG: Protein-Calory Advisory Group. PAG-guideline No. 6 on preclinical testing of novel sources of protein. PAG Bull 1974; 4:17-31.
14. Anusuya-Devi M, Venkataraman LV. Hypocholesterolemic effect of blue green algae *Spirulina platensis* in albino rats. Nutr Rep Int 1983; 28:519-30.
15. Kato T, Takemoto K, Katayama H, Kywaraba Y. Effects of *Spirulina (Spirulina platensis)* on dietary hypercholesterolemia in rats. J Jap Soc Nutr Food Sci 1984; 37:323-32 .
16. Iwata K, Inayama T, Kato T. Effects of *Spirulina platensis* on fructose-induced hyperlipidemia in rats. J Jap Soc Nutr Food Sci 1987; 40:4 63-7 .
17. González de Rivera C, Miranda-Zamora R, Díaz-Zagoya JC, Juárez-Oropeza MA. Preventive effect of *Spirulina maxima* on the fatty liver induced by a fructose-rich diet in the rat, a preliminary report. Life Sci 1993; 53:57-61.
18. Nakaya N, Honma Y, Goto Y. Cholesterol lowering effect of *Spirulina*. Nutr Rep Int 1988; 37:1329-37.
19. Becker EW, Jakober B, Luft D, Schmülling RM. Clinical and biochemical evaluations of the alga *Spirulina* with regard to its application in the treatment of obesity. A double-blind cross-over study. Nutr Rep Int 1986; 33:565-72.
20. Richmond A. *Spirulina*. In: Borowitzka MA, Borowitzka LT (eds). Micralgae biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press, 1988; 85-121.
21. Schwartz JL, Sklar G, Reid S, Trichler D. Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina dunaliella algae*. Nutr Cancer 1988; 11:127-34.
22. Nagao K, Takai Y, Ono M. Exercises of growing mice and effect of the intake of *Spirulina platensis* upon the hapten-specific immune response. Sci Phys Power 1991; 40:187-94.
23. Hayashi K, Hayashi T, Morita N. An extract from *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of Herpes simplex virus type I. Penetration into HeLa cells. Phytother Res 1993; 7:76-80.
24. Gustafson KR, Cardellina JH, Fuller RW, Weislow OS, Kiser RF, Snader KM, et al. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). J Natl Cancer Inst 1989; 81:1254-8.
25. Qishen P, Coleman A, Baojiang G. Radioprotective effect of extract form *Spirulina platensis* in mouse bone marrow cells studied by using the micronucleus test. Toxicol Lett 1989; 48:165-9.
26. Fukino H, Tagaki, Yamane Y. Effect of *Spirulina* (*S. platensis*) on the renal toxicity induced by inorganic mercury and cisplatin. Eisei Kagaku 1990; 36:.5.
27. Matsueda S, Nagalsi M, Shimpo K. Isolation and purification of the human erytrocyte-cholinesterase and the enzyme effect of *chlorella* components to the activity. Sci Rep Hiros Univ 1976; 23:17-23.
28. Takai Y, Hosoyamada Y, Kato T. Effect of water soluble and water insoluble fractions of *Spirulina* over serum lipids and glucose resistance of rats. J Jap Soc Nutr Food Sci 1991; 44:273-7.

29. Iwata K, Inayama T, Kato T. Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced by hyperlipidemic rats. J Nutr Sci Vitaminol 1990; 36:165-71.
30. Serrano-Molina JS. Terapéutica de la hiperuricemia y gota. En: Lorenzo-Velázquez B (ed), Farmacología y su proyección en la clínica. 15a ed. Madrid: Editorial Oteo, 1987:1035-41.
31. Becker EW. Nutritional properties of microalgae: potentials and constraints. In: Richmond A (ed). Handbook of microalgae mass culture. Boca Raton: CRC Press, 1986:339-419.
32. Jassey Y. Etude comparée des acides nucléiques de deux espèces de spirulines: *Spirulina platensis* Geitler et *Spirulina maxima* Geitler. CR Acad Sc Paris 1971; 273:2365-8.
33. Doull J. Recommended limits for exposure to chemicals. In: Klaasen CD (ed). Casarett & Doull's toxicology. The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 1996:1025-49.
34. Tulliez J, Bories G, Boudène C, Février C. Les hydrocarbures des algues *Spirulines*: nature, étude de devenir de l'heptadécane chez le rat et le porc. Ann Nutr Alim 1975; 29:563-72.
35. SARH: Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Dirección general de sanidad vegetal. Departamento de plaguicidas. México: SARH, 1978.
36. Lu FC. Toxicologie. Donées generales, procedures d'évaluation organes cibles, evaluation du risque. Paris: Masson, 1989.
37. Krishnakumari MK, Ramesh HP, Venkataraman LV. Food safety evaluation: acute oral and dermal effects of the algae *Senedesmus acutus* and *Spirulina platensis* on albino rats. J Food Protect 1981; 44:934-5.
38. Shibamoto T, Bjeldanes LF. Introduction to food toxicology. San Diego CA: Academic Press, 1993
39. Chamorro GA, Herrera G, Salazar M, Salazar S, Ulloa V. Subchronic toxicity study in rats fed *Spirulina*. Pharm Belg 1988;43:29-36.
40. Chamorro G, Herrera G, Salazar M, Salazar S, Ulloa V. Short-term toxicity study of alga *Spirulina* in F3b generation of rats. J Toxicol Clin Exp 1988;8:163-7.
41. Bourges H, Sotomayor A, Mendoza E, Chávez A. Utilization of the alga *Spirulina* as a protein source. Nutr Rep Int 1971; 4:31-43.
42. Bizzi A, Chiesara E, Clementi F, Della Torre P, Marabini L, Rizzi R, et al. Trattamenti prolungati nel ratto con diete contenenti proteine di *Spirulina*: aspeti biochimici, morfologici e tossicologici. In: Materassi R (ed). Atti del convegno. Prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia. Firenze: Accademia der Georgofili, 1980:205-28.
43. Contreras A, Herbert DC, Grubbs BG, Cameron IL. Blue-green alga, *Spirulina*, as the sole dietary source of protein in sexually maturing rats. Nutr Rep Int 1979; 19:749-63.
44. Yap TN, Wu JF, Pond WG, Krook L. Feasibility of feeding *Spirulina maxima*, *Arthrospira platensis* or *Chrolella sp*, to pigs weaned to a dry diet at 4 to 8 days of age. Nutr Rep Int 1982; 25:543-52.
45. Matty AJ, Smith P. Evaluation of yeast, a bacterium and an alga as protein source for a rainbow trout. Aquaculture 1978; 14:285-96.
46. Boudène CL, Collas E, Jenkins C. Recherche et dosage de divers toxiques minéraux dans les algues spirulines de différents origines, et evaluation de la toxicité a long term chez le rat d'un lot d'algues spirulines de provenance mexicaine. Ann Nutr Alim 1976; 30:577-88.
47. Yoshino Y, Hirai Y, Tabahashi H, Yamamoto N, Yamazaki N. The chronic intoxication test on *Spirulina* product fed to Wistar-strain rats. Jap J Nutr 1980; 38:221-5.
48. Chamorro GA, Herrera G, Salazar M, Salazar S, Ulloa V. Etude de la toxicité chronique de la *Spirulina* chez le rat. Med Nutr 1988; 24:104-6.
49. Christian MS, Hoberman AM. Current *in* vivo reproductive toxicology and development toxicity (teratology) test methods. In: Marquis JK (ed). A guide to general toxicology. 2nd ed. Basel: Karger, 1989:91-100.
50. Vander-Wal IP. Experiencia en Europa con las PUC como alimento para animales. Boletín GAP 1976; 6:37-47.
51. Chamorro G, Salazar M, Salazar S. Estudio teratogénico de *Spirulina* en rata. Arch Latinoamer Nutr 1989; 39:641-9.
52. Chamorro G, Salazar S, Salazar M, Pages N. Etude teratologique de la *Spirulina* chez le hamster. Belg J Food Chem Biotechnol 1988; 42:189-92.
53. Chamorro G, Salazar M. Estudio teratogénico de *Spirulina* en ratón. Arch Latinoamer Nutr 1990; 40:86-90.
54. Salazar M, Chamorro GA, Salazar S, Steele CE. Effect of *Spirulina maxima* consumption on reproduction and peri- and postnatal development in rats. Food Chem Toxicol 1996; 34:353-9.
55. Chamorro G, Salazar M, Izquierdo E, Salazar S, Ulloa V. Multigeneration study on reproduction and lactation in rats fed *Spirulina*. Arch Hydrobiol Beih 1985; 20:165-71.
56. Chung P, Pound WG, Kingsbury JM, Walker EF, Krool L. Production and nutritive value of *Arthrospira platensis*, a spiral blue-green alga grown in swine wastes. J Anim Ser 1978; 47:551-78.
57. Chamorro G, Salazar M. Dominant lethal assay of *Spirulina maxima* in male CD-1 mice after short-term and prolonged-term feeding. J Food Protect 1989; 52:125-7.
58. Salazar M, Chamorro G. Study of lethal dominant of *Spirulina maxima* in male rats. Sci Alim 1990; 10:713-8.
59. Chamorro G, Salazar M, Pages N. Lethal study of *Spirulina maxima* in male and female rats after short-term feeding Phytother Res 1996; 10:28-32.
60. Becker EW. Micro-algae for human and animal consumption. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ (eds). Micralgae biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press, 1988:222-56.
61. Morin O, Guihard R, Guihard D, Vermeil C. Nouvelle contribution a l'étude du role inhibiteur experimental de l'algue unicellulaire *Chlorella pyrenoidosa*. CR Sc Soc Biol 1980; 174:1-74.
62. Moore R. Toxins, anticancer agents, and tumor promoters from marine prokaryotes. Pure Appl Chem 1982; 54:1919-34.
63. Backer JT. Seaweeds in pharmaceutical studies and applications. Hydrobiologia 1984; 116/117:27-40.
64. Villar R, Laguna MR, Calleja JM, Cadavid J. Effects of *Sheletonema costatum* extracts on the central nervous system. Planta Med 1992; 58:398-404.
65. Villar R, Laguna MR, Calleja JM, Cadavid J. Effects of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella* tertiolecta extracts on the central nervous system. Planta Med 1992; 58:405-9.
66. Anca JM, Lamela M, Calleja JM. Activity on the central nervous system of *Himanthalia elongata*. Planta Med 1993; 59:218-20.
67. Laguna MR, Villar R, Cadavid J, Calleja JM. Effects of extracts of *Tetraselmis suecica* and *Isochrysis galbana* on the central nervous system. Planta Med 1993; 59:207-14.
68. Vázquez-Freire MJ, Lamela M, Calleja JM. *Laminaria ochroleuca* : a preliminary study of its effect on the central nervous system. Phytother Res 1992; 8:422-5.
69. Tamargo-Menéndez J. Antiateromatosos. En: Lorenzo-Velázquez B (ed). Farmacología y su proyección en la clínica. 15a ed. Madrid: Editorial Oteo, 1987; 513-23.

70. Brody MJ, Feldman RD, Kent-Hermsmeyer R. Fármacos cardiovasculares. En: Conn PM, Gebbart GF (eds). Principios de farmacología. México : El Manual Moderno, 1991:225-70.
71. Rolle J, Pabst W. Uber die cholesterinsenkende wirkung der einzellingen grunalge *Scenedesmus acutus* 276-3a. I. Wirkung von walzengetrockneter algensubstanz. Nutr Metab 1980; 24:291-301.
72. Rolle J, Pabst W. Uber die cholesterinsenkende wirkung der einzellingen grunalge *Scenedesmus acutus* 276-3a. II. Wirkung von algenfractionen. Nutr Metab 1980; 24:302-13.
73. Tanaka Y, Akuda M, Sonoda M. The effect of *Chlorella* on the levels of cholesterol and triglyceride in liver and serum. Artery 1975; 1:339-47.
74. Anusuya-Devi L, Venkataraman LV, Rajasekaran T. Hypocholesterolemic effect of diets containing algae on albino rats. Nutr Rep Int 1979; 20:83-90.
75. Klausner A. Algaculture: food for thought. Biotechnology 1986; 4:947-53.
76. Barchi JJ, Moore RE, Patterson GML. Acutiphycin and 20, 21-didehydroacutiphycin new antineoplastic agents from the cyanophyte *Oscillatoria acutissima*. J Am Chem Soc 1984; 8193-7.
77. Noda H, Amano H, Arashinia K, Nisizawa K. Antitumor activity of marine algae. Hidrobiología 1990; 204/205:577-84.
78. Ren DL, Wang JZ, Noda H, Amano H, Ogawa S. The effects of an algal polysaccharide from *Gloipeltis tenax* on transplantable tumors and immune activities in mice. Planta Med 1995; 61:120-5.
79. Miki W, Yamaguchi k, Konosu S. Carotenoid composition of *Spirulina maxima*. Bull Jap Soc Sci Fish 1986; 57:1225-7.
80. Fedkovic Y, Astre C, Pinguet F, Gerber M, Ychou M, Pujol H. *Spiruline* et cancer. Bull Inst Ocean 1993; 12:117-20.
81. Pascaud M. The essential polyunsaturated fatty acids of *Spirulina* and our immune response. Bull Inst Ocean 1993; 12:49-57 .
82. Fukuchi K, Sakagami H, Okuda T. Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. Antiviral Res 1989; 285-98.
83. Thorne HV, Clarke GF, Skuce R. The inactivation and partial characterization of *Prunellin vulgaris*. Antiviral Res 1989; 11:263-74 .
84. Amoros M, Fauconnier B, Girre RL. *In vitro* antiviral activity of a saponin from *Anagalis arvensis* primulaceae against herpes simplex virus and poliovirus. Antiviral Res 1987; 8:13-25.
85. Amoros M, Fauconnier B, Girre RL. Effect of saponins from *Anagallis arvensis* on experimental herpes simplex keratitis in rabbits . Planta Med 1988; 2:128-31.
86. Lagrota MHC, Wigg MO, Santos MMG, Camara FP, Couceiro JS, Costa SS. Inhibitory activity of extracts of *Altermanthera brassliana* (Amaraythaceae) against the Herpes simplex virus. Phytother Res 1994; 8:358-61.
87. Pacheco P, Sierra J, Schmeda-Hirschmann G, Potter CW, Jones BM, Moshref M. Antiviral activity of Chilean medicinal plant extracts. Phytother Res 1993; 7:415-8.
88. Cavallaro L, García G, Broussalis A, Ferraro X, Martino V, Coussio J, et al. Antiherpes *in vitro* activity of *Gamochaeta simplicicaulis* extract. Phytother Res 1995; 9:176-9 .
89. Tabba HD, Chang RS, Smith KM. Isolation, purification of herpes simplex virus by some Solanaceae glycoalkaloids. Antiviral, Res 1985; 5:335-43.
90. Suzuki H, Tochikura TS, Iiyama K, Yamazaki S, Yamamoto N, Toda S. Lignosulfonate, a water-solubilized lignin from the waste liquor of the pulping process, inhibits the infectivity and cytopathic effects of human immunodeficiency virus *in vitro*. Agric Biol Chem 1989; 53:3369-72.
91. Nishizawa M, Yamagishi T, Dutschmann GC. Anti-AIDS agents. I. Isolation and characterization of four new tetragalloyl acids as a new class of HIV reverse-transcriptase inhibitors from tannic acid. J Nat Prod 1989; 52:762-8.
92. Kusumoto IT, Shimada J, Kakiuchi N, Hattori M, Mamba T. Inhibitory effects of Indonesian plant extracts on reverse transcriptase of an RNA tumour virus. Phytother Res 1992; 6:241-4.
93. Dumenil G. Methods d'evaluation de l'activité mutagène ou antimutagène de substances naturalles. Lett Inf Soc Franc Ethnopharmacol 1993; 10:50-60.
94. Waters MD, Brady AL, Stack HF, Brockman HE. Antimutagenicity profiles for some model compounds. Mutation Res 1990; 238:57-85.
95. Rivas-Olmedo G, Díaz-Barriga S, Madrigal-Bujaidar E. Inhibition of mytomicin C-induced sister chromatid exchanges by Vit C *in vivo*. J Toxicol Environ Health 1992; 35:107-13.
96. Dubacq JP, Pham-quoc K. Biotechnology of *Spirulina* lipids: a source of gamma-linolenic acid. Bull Inst Ocean 1993; 12:59-64.
97. Müller-Wecker H, Kofranyi E. Zur bestimmung der biologischen wrtigkeit von nahrungsproteimen. XVIII. Einzellerals zusätzliche nahrungsquelle. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 1973; 354:1034-42.
98. Feldheim W. Untersuchungen über die verwendung von mikroalgen in der menschlichen ernährung. I. Ernährungsv ersuche mit algenhaltigen kost formen in Thailand. Int J Vit Nutr Res 1972; 42:600-6.
99. Feldheim W, Payer HD, Saovakontha, Pongpaew P. The uric acid level in human plasma during a nutrition test with microalgae in Thailand. SEA J Trop Med 1973; 4:413-6.
100. Waslien CI, Calloway OH, Margen S, Costa F. Uric acid levels in men fed algae and yeast as protein sources. J Fd Sci 1970; 35:294-8.
101. Yannai S, Mohady S, Sachs K, Kantorowitz B, Berk Z Secondary toxicology and contaminants of algae grown on waste water. Nutr Rep Int 1979; 19:391-400.
102. Yannai S, Mokady S. Short-term and multigeneration toxicity test of algae grown in wast water as a source of protein for several animal species. Arch Hydrobiol Beih 1985; 20:173-9.
103. Becker EW. The legislative background for utilization of microalgae and other types of single cell protein. Arch Hydrobiol Beih 1978;11:56-64.
104. Ciferri O, Tiboni O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. Ann Rev Microbiol 1995; 39:503-26.
105. Pabst W, Payer HD, Rolle I, Soeder CJ. Multigeneration feeding studies in mice for safety evaluation of the microalga *Scenedesmus acutus*. I. Biological and haematological data. Food Cosm Toxicol 1978; 16:249-54.