



**PRESENCIA DE CIANOTOXINAS EN
SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS A BASE DE
CIANOBACTERIAS**



MARÍA GARCÍA-TOMÉ SÁNCHEZ-ARJONA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

PRESENCIA DE CIANOTOXINAS EN SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS A BASE DE CIANOBACTERIAS

Trabajo de Revisión Bibliográfica

María García-Tomé Sánchez-Arjona

Facultad de Farmacia, Sevilla.

21 de Septiembre 2016

Tutores

Dra. Sara Maisanaba Hernández

Dra. Remedios Guzmán Guillén

Dpto. Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal

Área de Toxicología



Universidad de Sevilla



Facultad de Farmacia

RESUMEN

Las cianobacterias son organismos procariotas, de amplia diversidad morfológica y una reconocida antigüedad evolutiva. Estos organismos contienen una gran cantidad de compuestos que pueden ser empleados para suplir necesidades nutricionales y energéticas de la población, dando lugar a los conocidos suplementos alimenticios a base de cianobacterias (BGAs). No obstante, el mayor riesgo que se presenta es que también pueden producir toxinas (cianotoxinas) a partir del metabolismo secundario, las cuales están relacionadas con efectos negativos sobre la salud humana. Los riesgos por exposición a estas cianotoxinas presentes en BGAs han sido evaluados y revisados por distintos autores. De hecho, la Organización Mundial de la Salud ha propuesto límites provisionales para el agua de consumo para determinadas cianotoxinas, así como una ingesta diaria tolerable (IDT) de las mismas, con el fin de proteger a los consumidores de los efectos adversos. No obstante, aunque no se excedan los límites propuestos, se debe prestar atención especialmente al consumo crónico, la acumulación y las posibles consecuencias y riesgos de exposición, ya que no existe un nivel de dosis establecido para BGAs. La bibliografía actual demuestra que las cianotoxinas pueden estar presentes y acumularse en una amplia variedad de organismos de consumo humano incluso a concentraciones superiores a la IDT. La acumulación de cianotoxinas en BGAs da consciencia de la importancia de los alimentos como vía de exposición y entrada de las mismas al cuerpo humano. Los resultados obtenidos hasta el momento dejan ver la necesidad de dar información clara a los consumidores sobre posibles riesgos para la salud derivados del consumo de estos suplementos, así como de la formulación e implementación de medidas a través de leyes nacionales e internacionales necesarias para preservar la salud humana.

Palabras claves: Blue green algae supplements (BGAs); microcistinas; cianotoxinas; cianobacterias; *Spirulina*

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Cianobacterias y cianotoxinas	2
1.2. Clasificación de cianotoxinas	2
1.2.1. Hepatotoxinas.....	3
1.2.2. Neurotoxinas.....	5
1.2.3. Citotoxinas	5
1.3. Vías de exposición a cianotoxinas.....	6
1.4. Efectos por exposición a cianotoxinas.....	7
1.5. Suplementos alimenticios a base de cianobacterias (BGAs)	7
1.5.1. <i>Spirulina</i>	8
1.5.2. <i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	8
1.6. Métodos para la detección de cianotoxinas.....	9
2. OBJETIVO.....	10
3. METODOLOGÍA	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
5. CONCLUSIONES	19
6. BIBLIOGRAFÍA.....	21

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cianobacterias y cianotoxinas

Las cianobacterias (antiguamente llamadas algas verdes-azuladas) son organismos unicelulares, procariotas, capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica, ampliamente distribuidos en ambientes acuáticos, suelo y otras superficies húmedas (Doyle, 2011). Aunque son más frecuentes en zonas tropicales, pueden sobrevivir en ambientes muy inhóspitos tales como manantiales calientes, desiertos y la tundra ártica (Doyle, 2011; Chatziefthimiou y cols., 2016).

Debido a la eutrofización progresiva de las masas de agua, al cambio climático, a determinadas condiciones de luz y temperatura y al aumento de los niveles de nutrientes, particularmente fósforo y nitrógeno procedente de actividades agrícolas, las cianobacterias pueden crecer rápidamente formando una lámina verde viscosa conocida como “*floración*” o “*bloom*”, cubriendo grandes áreas de la superficie (Doyle, 2011). Las floraciones de cianobacterias se consideran perjudiciales cuando conducen a impactos ambientales negativos, como la mortalidad y la inestabilidad de los ecosistemas (Chorus, 2001). Se estima que el 25-75% de las floraciones de cianobacterias son tóxicas (Chorus, 2001), por su capacidad de producir una amplia gama de toxinas, llamadas cianotoxinas (Carmichael y cols., 2001). Esto supone una preocupación ya que son un riesgo tanto para los seres humanos y animales que los consumen, como para el medio ambiente (Quesada y cols., 2006; O’Neil y cols., 2012). Los principales géneros de cianobacterias, por la repercusión sanitaria y medioambiental, así como por la producción de toxinas son: *Anabaena*, *Chrysochloris* (*Aphanizomenon*), *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria* y *Lyngbya* (Corbel y cols., 2014).

1.2. Clasificación de las cianotoxinas

Las cianotoxinas son muy diversas tanto por su estructura química como por su toxicidad (Briand y cols., 2003), y se pueden clasificar de la siguiente manera según los sistemas y órganos donde ejercen sus efectos preferentemente (Wood, 2016):

- Hepatotoxinas: microcistinas y nodularinas.
- Neurotoxinas: anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a (S), saxitoxinas.
- Citotoxinas: cilindrospermopsinas.
- Dermatotoxinas: aplisiatoxina y lingbyatoxinas.
- Toxinas irritantes: lipopolisacáridos (LPS).

De todas las cianotoxinas, las más ampliamente distribuidas y estudiadas son las microcistinas (MCs) (Chorus y Bartram, 1999).

1.2.1. Hepatotoxinas:

Dentro de este grupo podemos destacar las MCs, las cuales son péptidos cíclicos que constan de siete aminoácidos. Hasta la fecha se han descrito más de 100 variantes estructurales diferentes, dependiendo de los aminoácidos en las posiciones 2 y 4 y las desmetilaciones en posiciones 3 y 7 (Wu y cols., 2014). El aminoácido ADDA (3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-ácido dienoico) es común a todas ellas y el más característico por considerarse responsable de su toxicidad. Así, tenemos los congéneres más comunes: MC-LR con leucina (L) y arginina (R), MC-RR con dos residuos de R, y MC-YR con tirosina (Y) y R en las posiciones 2 y 4, respectivamente (Carmichael, 1998) (Fig.1).

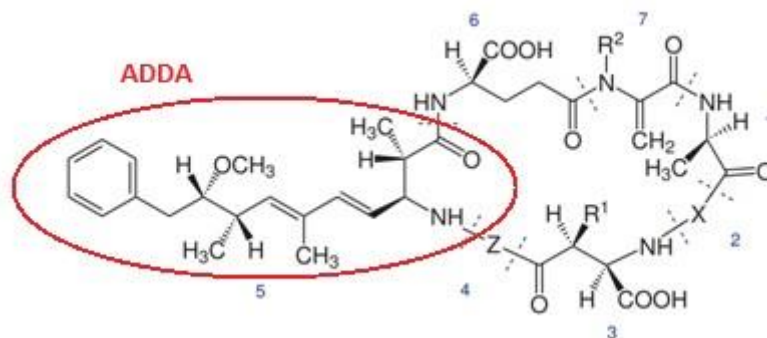


Figura 1. Estructura química de las microcistinas.

Las MCs son térmicamente estables y solubles en agua y están generalmente contenidas en las células vivas, pero son liberadas al medio cuando las células mueren o se lisan, como por ejemplo, tras el tratamiento de las aguas con sulfato de cobre. Son

producidas por varios géneros de cianobacterias, como *Microcystis*, *Planktothrix* spp., *Anabaena* y *Nostoc* spp. (Funari y Testai, 2008).

Su mecanismo de acción está asociado con la inhibición específica de fosfatasa de las proteínas serina/treonina (PP1 y PP2A), alterando la fosforilación de las proteínas celulares implicadas en la transducción de señales (Gehring, 2004). El estrés oxidativo también constituye un importante mecanismo de acción por la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) demostrado *in vitro* (Nong y cols., 2007; Pichardo y cols., 2007; Puerto y cols., 2009b,c, 2010; Zhang y cols., 2008) e *in vivo* (Atencio y cols., 2008; Ding y cols., 1998; Jos y cols., 2005). También pueden actuar como promotores tumorales. En este sentido, la MC-LR ha sido clasificada como “posiblemente cancerígena para los seres humanos” (grupo 2B) por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC).

Los riesgos para la salud por exposición a MCs, han llevado a la Organización Mundial de la Salud (OMS), (WHO, 1998) a establecer una ingesta diaria tolerable provisional (IDTP) de 0,04 µg MC-LR/kg de peso corporal/día y un valor guía recomendado de 1 µg/L en el agua potable (van Apeldoorn y cols., 2007).

Por otro lado, las nodularinas (NODs) comparten con las MCs una estructura química similar, ya que son péptidos cíclicos con 5 aminoácidos (Fig. 2) y cuentan también con la capacidad de producir inhibición de fosfatasa (Yoshizawa y cols., 1990).

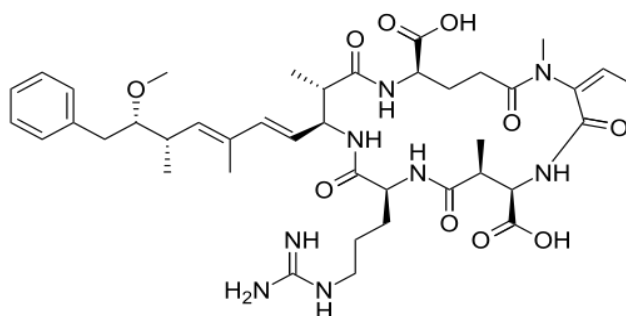


Figura 2. Estructura química de las nodularinas.

Aunque las NODs son promotoras de tumores (Song y cols., 1999), de acuerdo con la evaluación de la IARC no son clasificables en cuanto a su carcinogenicidad en

seres humanos (Grupo 3), debido a la escasez de datos disponibles hasta el momento (IARC, 2006).

1.2.2. Neurotoxinas

Aunque con diferentes mecanismos, todas las neurotoxinas que se conocen actúan sobre el sistema neuromuscular mediante el bloqueo de los músculos esqueléticos y respiratorios, lo que lleva a la muerte por insuficiencia respiratoria. Las principales toxinas englobadas en este grupo son anatoxinas y saxitoxinas. La anatoxina-a es el éster fosfórico de N-hidroxiguanidina, que inhibe irreversiblemente la actividad de la acetilcolinesterasa en las uniones neuromusculares, bloqueando la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, que se acumula provocando hiperexcitabilidad del sistema nervioso (Carmichael y Falconer, 1993).

1.2.3. Citotoxinas

Dentro del grupo de las citotoxinas cabe destacar la cilindropermopsina (CYN), la cual es un alcaloide tricíclico derivado de la guanidina combinado con un grupo de hidroximetiluracilo (Fig. 3).

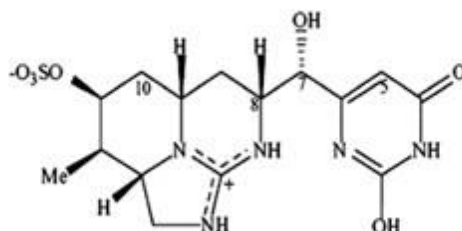


Figura 3. Estructura química de la cilindropermopsina.

Hasta la fecha se han descubierto 5 variantes: la CYN, 7-epicilindropermopsina, 7-desoxicilindropermopsina, 7-desoxi-desulfo-cilindropermopsina, 7-desoxi-desulfo-12-acetilcilindropermopsina (Wimmer y cols., 2014). Se considera una citotoxina, ya que produce efectos tanto hepatotóxicos como nefrotóxicos, aunque otros órganos como son bazo, intestinos, timo y corazón, entre otros, también pueden resultar dañados tras la exposición a la misma (Ohtani y cols., 1992; Terao y cols., 1994; Falconer y cols., 1999; Seawright y cols., 1999). La CYN es altamente hidrófila,

encontrándose disuelta en el agua en un 70-98%, lo que la hace una toxina principalmente extracelular (Van Apeldoorn y cols., 2007).

El mecanismo de acción de la CYN se ha asociado con la inhibición irreversible de la síntesis de proteínas (Terao y cols., 1994) y de glutatión (GSH) (Runnegar y cols., 1994; Humpage y cols., 2005), con la fragmentación del ADN (Žegura y cols., 2011) y, demostrado más recientemente por estudios *in vitro* e *in vivo*, con el estrés oxidativo (Gutiérrez-Praena y cols., 2011a, b; Guzmán-Guillén y cols., 2013; Puerto y cols., 2011; Wimmer y cols., 2014).

Debido a la toxicidad y ubicuidad de la CYN, la OMS está estudiando establecer como valor guía en aguas de consumo el propuesto por Humpage y Falconer (2003) de 1 µg CYN/l. Este valor de seguridad también ha sido adoptado por el gobierno de Nueva Zelanda, aunque Brasil ha establecido uno muy distinto (15 µg/l) (Burch, 2006). El resto de los países, entre ellos España, carece de legislación al respecto. Del mismo modo, no se ha adoptado todavía ningún valor guía para la CYN en aguas recreativas y de baño. En cuanto a los límites de consumo de la CYN, la ingesta diaria tolerable (IDT) es 0,03 µg/kg p.c. (Humpage y Falconer, 2003).

1.3. Vías de exposición a cianotoxinas

Los seres humanos pueden estar expuestos a cianotoxinas directa o indirectamente. Las vías de exposición directas incluyen la ingestión a través del agua potable, así como el contacto dérmico por baño o natación, la inhalación de partículas de aerosol durante duchas, o, el contacto durante la realización de deportes acuáticos, así como la vía intravenosa a través de procedimientos médicos. La exposición indirecta puede ocurrir a través del consumo de productos animales o vegetales que han sido expuestos a cianotoxinas incluyendo los suplementos alimenticios a base de cianobacterias (*Blue green algae supplements*, BGAs). De todas, la vía oral constituye la más importante, a través del consumo de agua potable o alimentos contaminados (incluyendo los suplementos), o por la ingestión de agua durante actividades recreativas (Wood, 2016). Se ha demostrado que las cianotoxinas pueden bioacumularse de forma que sus efectos tóxicos pueden verse magnificados en la cadena alimentaria (Berry y Lind, 2010).

1.4. Efectos por exposición a cianotoxinas

Tras la exposición a cianotoxinas, los síntomas más característicos son dolor abdominal, vómitos, diarrea, irritación de la piel, debilidad y dolor de garganta, así como palidez en la membrana mucosa (Chorus y Bartram, 1999). A concentraciones suficientemente altas, estas toxinas podrían causar la muerte por parada respiratoria o insuficiencia hepática, en un rango de unos pocos minutos a unas pocas horas, como ocurrió en el caso fatal de intoxicación a través de hemodiálisis en Caruaru, Brasil (Jochimsen y cols., 1998). La exposición crónica a dosis bajas de algunas hepatotoxinas también se ha asociado con la promoción de tumores (Chen y cols., 2009).

1.5. Suplementos alimenticios a base de cianobacterias (BGAs)

Las cianobacterias están normalmente ligadas a desastres ambientales y al envenenamiento de plantas y animales (incluyendo seres humanos). Sin embargo, también se usan frecuentemente como suplementos alimenticios. Esto se debe a que algunos géneros de cianobacterias como *Spirulina*, *Aphanizomenon*, *Botryococcus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* y *Nostoc* han sido reconocidas como fuente de compuestos bioactivos y pigmentos naturales beneficiosos para la salud humana, como aminoácidos, minerales, vitaminas, ácidos grasos, β -carotenos y clorofila (Gutiérrez-Praena y cols., 2013). Asimismo, cuentan con diversas actividades biológicas beneficiosas como: antiinflamatoria, antibacteriana, antiviral, anticancerígena, antioxidante, hipocolesterolemica e hipotrigliceridémica y propiedades estimulantes del sistema inmune (Knubel y cols., 2012), haciéndolas de utilidad para uso médico (Gutiérrez-Praena y cols., 2013). No obstante, hasta la fecha, ninguno de los efectos beneficiosos ha sido científicamente ni clínicamente confirmado. Por otra parte, la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) ordenó a las empresas que comercializan BGAs indicar claramente que estos productos no tienen capacidades curativas o farmacéuticas (Federal Trade Commission Bureau of Consumer Protection, 2001).

Debido a que las cianobacterias coexisten en el mismo hábitat con otras potencialmente tóxicas, como *Microcystis* sp., hay un riesgo potencial a la exposición

de cianotoxinas a través de la producción de cultivos que han sido contaminados por cepas productoras de toxinas o confundidos con especies productoras (Dittmann y Wiegand, 2006; Carmichael y cols., 2000). Los BGAs se pueden dividir en tres grupos principales: *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* y *Chlorella Pyrenoidosa*, siendo las dos primeras las más comúnmente utilizadas para su producción (Jiang y cols., 2008).

1.5.1. *Spirulina*

La *Spirulina* procede principalmente de dos géneros de cianobacterias filamentosas, *S. platensis* y *S. maxima* (Belay y cols., 1994). Se produce comúnmente bajo condiciones de cultivo, predominantemente en China, en concreto en el lago Chenghai (provincia de Yunan, China) y en sistemas de estanques abiertos, donde se controla el crecimiento de las especies de cianobacterias no deseadas (Jiang y cols., 2008). El contenido de proteínas (50-70% peso seco (p.s.)) incluye todos los aminoácidos esenciales, en particular leucina, valina e isoleucina, y presenta una alta digestibilidad (83-90%) (Hoseini y cols., 2013). Es una fuente de ácidos grasos insaturados, vitaminas del grupo B y varios minerales, especialmente hierro (Belay y Houston, 2002). Además de clorofila, *Spirulina* contiene ficocianina, un pigmento azul con poder antioxidante (Martelli y cols., 2014). Hasta la fecha, *Spirulina* está considerada como cianobacteria no productora de toxinas (Marles y cols., 2011; Yang y cols., 2011).

1.5.2. *Aphanizomenon flos-aquae*

Otra especie de cianobacterias que es adecuada para el consumo humano por no poseer un perfil tóxico descrito hasta el momento es *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA). Debido a la dificultad de cultivar AFA en condiciones de laboratorio, ésta se produce principalmente en lagos naturales de EE.UU., sobre todo en el lago Klamath (Oregón) (Belay y Houston, 2002; Carmichael y cols., 2000; Gilroy y cols., 2000). Por este motivo, los BGAs obtenidos a partir de AFA pueden ser contaminados por otras especies de cianobacterias capaces de producir cianotoxinas (como *M. aeruginosa* y *A. ovalisporum*), siendo un riesgo para la salud de los seres humanos (Gutiérrez-Praena y cols., 2013).

Estos productos alimenticios son consumidos por los seres humanos con frecuencia en grandes cantidades y durante períodos largos de tiempo, siguiendo las sugerencias de los fabricantes. Este tipo de consumo aumentaría el riesgo de exposición de los consumidores en el caso de contaminación de los BGAs por cianobacterias productoras de cianotoxinas, pudiéndose desencadenar los consiguientes efectos sobre la salud anteriormente comentados (Heussner y cols., 2012).

1.6. Métodos para la detección de cianotoxinas

Entre los métodos más destacados para la detección de cianotoxinas podemos encontrar:

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siendo el método más común para la determinación de MCs. Generalmente, se utiliza combinada con detector ultravioleta (UV) o espectrometría de masas (MS) o masas/masas (MS/MS), siendo este último más sensible y selectivo para la identificación de los distintos tipos de MCs (Pérez y Aga, 2005). El test de inhibición de la proteína-fosfatasa (PPI) es un ensayo enzimático de gran sensibilidad que toma la reducción de la desfosforilación de las PP1 y PP2A como medida indirecta de la concentración de MCs. Existe una buena correlación lineal entre los resultados obtenidos por HPLC y los obtenidos por el método de PPI (Ramírez y cols., 2004).

Por otro lado, los métodos moleculares de análisis se aplican hoy en día ampliamente en la investigación de cianotoxinas porque son simples, rápidos, eficaces, extremadamente sensibles y específicos, ya que permiten el análisis simultáneo de varios productos (Pearson y Neilan, 2008). En cuanto a los ensayos inmunológicos, se han desarrollado anticuerpos monoclonales y el ensayo ELISA (ensayo de inmunodetección). Este ensayo es un inmunoanálisis aplicado a la cuantificación de las toxinas en muestras biológicas con un nivel sensible de detección (Yilmaz y cols., 2008; Bláhová y cols., 2009; Berry y Lind, 2010). Puede ser usado como un ensayo de screening (Pérez y Aga, 2005) aunque se han detectado falsos positivos para MC-LR (Ramírez y cols., 2004).

2. OBJETIVO

Debido al potencial riesgo para la salud humana asociado al consumo de BGAs y a la falta de dosis exactas de consumo, se han llevado a cabo numerosas investigaciones con el fin de estudiar la toxicidad presente en los mismos y reducir las consecuencias asociadas. El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre estas investigaciones que evidencian la presencia de cianotoxinas en BGAs, constando como principal problema la acumulación de estas toxinas ante un posible consumo crónico inadecuado.

3. METODOLOGÍA

Para la elaboración de la presente revisión bibliográfica se han empleado diversas bases de datos como fuentes de información, tales como Scopus, ScienceDirect y Pubmed, que facilitan el acceso al material (artículos científicos) utilizados en el presente trabajo. En cuanto a la franja de tiempo establecida para filtrar estudios más recientes, la revisión se centra en los últimos diez años, como se muestra en la Figura 4.

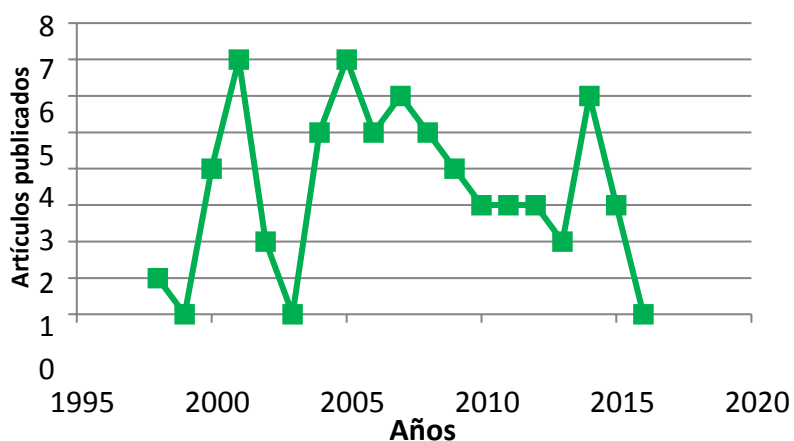


Figura 4. Evolución de los estudios sobre presencia de cianotoxinas en BGAs. Eje X: años de desarrollo de revisión; eje Y: artículos publicados en los que se basa la revisión principalmente.

Como palabras clave principales para la búsqueda de artículos científicos en los buscadores previamente mencionados caben destacar: *Cyanobacteria*, *Cyanotoxins*, *Algae food supplements*, *BGAs*, *Cyanobacterial food supplements*, *Spirulina*,

Microcystins, Aphanizomenon Dietary supplements, Health food supplements y *Blue-green algae*. Y como palabras clave secundarias se han empleado: *Bioaccumulation, Cyanotoxins detection, Cyanotoxins effects, Cyanobacterial blooms*.

Como herramienta de traducción se han utilizado fundamentalmente conocimientos propios de la lengua inglesa, consultando en caso de duda el diccionario Word Reference, así como a las correcciones de las propias tutoras.

Los criterios de inclusión en los que he basado la elección de los artículos científicos han sido: a) seleccionar aquellos que tratan principalmente sobre el contenido de toxinas en BGAs, ya que es el objetivo que se persigue; b) relevancia de los mismos según el número de veces que han sido citados cada uno de ellos, y si eran citados en otros artículos de interés empleados; c) año de publicación, si se trata de un artículo publicado recientemente con datos actualizados; d) accesibilidad a artículos publicados en los buscadores empleados, ya que en algunos casos sólo está permitido acceder al resumen; e) el lugar de desarrollo del estudio, si contempla nuevos escenarios o por el contrario continúa desarrollando evaluaciones de trabajos previo. En cuanto a los criterios de exclusión: a) artículos sobre BGAs retractados tras ser publicados; b) artículos que tratan sobre cianotoxinas pero no incluyen información sobre BGAs; c) artículos que han sido re-analizados y actualizados, centrando la revisión en los más recientes y que aportan más información, así como uso de nuevos métodos.

El proceso de orientación y seguimiento del presente trabajo se ha fundamentado en reuniones semanales o quincenales, llevándose a cabo la doble corrección por parte de las tutoras en las que se han explicado las modificaciones de la memoria, así como se han expuesto las indicaciones e ideas sobre cómo orientar y organizar toda la información recopilada de las referencias estudiadas.

La revisión se fundamenta en el campo de la toxicología, aunque también se citan aspectos de otras áreas como biología, botánica, biotecnología y química analítica, especialmente en lo relativo a las técnicas de determinación de las cianotoxinas.

Ciertas imágenes de la revisión bibliográfica han sido obtenidas y/o adaptadas de los distintos documentos científicos consultados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cianobacterias están normalmente ligadas a desastres ambientales, y a la contaminación de plantas y animales (incluyendo seres humanos). Sin embargo, también son usadas como suplementos alimenticios ya que poseen una gran variedad de nutrientes que son beneficiosos para los humanos, como aminoácidos, minerales, vitaminas, ácidos grasos, β -carotenos y clorofila (Dittmann y Wiegand, 2006). Su gran variedad de propiedades (anticancerígena, hipolipemiante, antioxidante, antibacteriana, actividades antivirales, etc.), permite que sean útiles en aplicaciones médicas (Gutiérrez-Praena y cols., 2013).

Debido al alto riesgo para la salud humana asociado al consumo de BGAs, se han llevado a cabo numerosas investigaciones con el fin de estudiar la posible toxicidad presente en los mismos, así como los efectos que pueden desencadenar. Si bien es ampliamente reconocido que la exposición a MCs en el agua potable representa un riesgo de salud significativo, el potencial de exposición a dichas cianotoxinas es significativamente mayor para los consumidores de productos BGAs. (Gilroy y cols., 2000). La escasez de trabajos que tratan la presencia de cianotoxinas (aparte de MCs) en ambientes de agua dulce, en productos alimenticios o el estudio de su toxicidad, da una impresión errónea de que son de menor preocupación en relación con la salud humana (Testai y cols., 2016). Uno de los principales problemas es la disponibilidad de un método analítico fiable en estas matrices. En efecto, mientras que los métodos han sido validados para la detección de toxinas en el agua, la situación es todavía problemática cuando se refiere a matrices complejas (alimentos y otras muestras biológicas como los BGAs). Por otra parte, la técnica de detección utilizada es sólo el extremo de la cadena analítica; el tratamiento de la muestra es igual o más importante ya que afectará el resultado final (Testai y cols., 2016). El uso de protocolos de limpieza ("*clean up*") en el análisis de cianotoxinas ha sido usado en gran medida con el objetivo de reducir las interferencias debidas a la matriz (Jiang y cols., 2008), con

el inconveniente de que podría haber pérdidas de toxina durante el proceso (Testai y cols., 2016).

Otro de los principales problemas reside en el control de la ingesta, ya que el consumo de toxinas presentes en el agua potable está naturalmente limitado por las tasas de consumo (con un promedio de 1,5 a 2 l/día), pero existe una problemática importante en el caso de los BGAs, ya que no hay un límite de la cantidad que se puede consumir. Usuarios de estos productos han informado de que las tasas de consumo pueden llegar hasta 20 g/día. Así, la exposición a MCs a través de BGAs puede llegar a ser mayor que a través del agua potable (Gilroy y cols., 2000).

La contaminación de BGAs puede deberse a la ubicación inadecuada de los estanques de cultivo (por ejemplo, cerca de las zonas rurales, industriales o agrícolas). La calidad ambiental de estos estanques puede verse afectada por algunos contaminantes tales como metales y especies de cianobacterias potencialmente tóxicas como *M. aeruginosa* (Vichi y cols., 2012). La posibilidad de cambios en los perfiles toxicológicos de las toxinas producidas por algunas especies, bajo estrés ambiental, es un problema adicional con motivo de preocupación (Bernard y cols., 2011).

Se ha demostrado ampliamente que estos elementos contaminantes (metales y cianotoxinas) poseen una gran capacidad de bioacumularse en cianobacterias a través de procesos de absorción, por lo tanto, los productos finales fabricados a partir de dicha biomasa pueden ser potencialmente peligrosos para la salud humana (Rzymiski y cols., 2014a, b). Además, como algunos BGAs están específicamente dirigidos a bebés y niños con trastornos de hiperactividad de déficit de atención (TDAH), estos grupos de consumidores podrían estar potencialmente más expuestos a MCs (Dietrich y Hoeger, 2005; Ibelings y Chorus, 2007; Heussner y cols., 2012; Vichi y cols., 2012).

Cada cianotoxina puede ser producida por más de una especie de cianobacteria, como también la misma especie tiene la capacidad de producir más de una toxina y de esta forma contaminar en gran medida los productos finales. Dentro de una sola especie, pueden concurrir distintos genotipos, algunos de los cuales poseen el gen para producir toxinas y otros no (Kurmayer y cols., 2002). Por tanto, las

variaciones en las concentraciones de cianotoxinas detectadas en los lagos son el resultado de poblaciones dinámicas (Dittman y Börner, 2005).

Para proteger a los consumidores de los efectos adversos de toxinas y, mediante la aplicación de un enfoque similar al utilizado por la OMS para el agua potable, con un valor límite provisional de 1 µg/l para MC-LR, y una IDT para MC-LR en BGAs de 1 µg/g p.s. (WHO, 1998, 2006), la División de Salud y el Departamento de Agricultura de Oregón establecieron un límite reglamentario de 1 µg MCs/g p.s. de BGAs, al encontrar MCs en 85 de 87 muestras analizadas, con 63 muestras (72%) que contenían concentraciones > 1 µg/g (Gilroy y cols., 2000). Sin embargo, este límite no tiene ningún valor legal, y se han encontrado niveles superiores de dichas cianobacterias en un número considerable de muestras comercializadas (Gilroy y cols., 2000; Dietrich y Hoeger, 2005).

En cuanto a los análisis realizados en BGAs a base de *Spirulina*, productos procedentes de EE.UU. analizados mediante ELISA presentaban un rango promedio de 0,15 a 0,52 µg MC-LR eq/g y la concentración máxima fue 2,12 µg MC-LR eq/g, siendo MC-LR la variante de MC más tóxica, el congénere predominante junto a MC-LA (Tabla 1) (Gilroy y cols., 2000). Debido a que la potencia tóxica de esta última es similar a la de MC-LR (Harada, 1996), es probable que el uso de ELISA para el análisis de MCs en BGAs subestime, hasta cierto punto, la presencia de MCs tóxicas (Gilroy y cols., 2000). Posteriormente, Jiang y cols. (2008) analizaron 36 tipos de productos comerciales de *Spirulina* de diversos orígenes, detectando cantidades muy pequeñas de las tres MCs más comunes (-LR, -RR e -YR) mediante LC-MS/MS, conteniendo el 94% de las mismas concentraciones en un rango medio de 2-136 ng/g de MCs y un máximo de 0,163 µg MCs/g (Tabla 1).

A pesar de que la *Spirulina* se encuentra en la lista de sustancias GRAS (generalmente reconocida como segura) de la FDA (Testai y cols., 2016), se han identificado epoxianatoxina-a e hidrohomoanatoxina-a en BGAs de *Spirulina* (Draisci y cols., 2001). Además, también fue evidenciada su capacidad de producir pequeñas concentraciones de MCs y anatoxinas (Ballot y cols., 2004, 2005).

Es posible comparar el nivel de MC-LR ingerido diariamente con el valor provisional de IDT propuesto por la OMS de 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$; cuando los niveles de exposición son inferiores a la IDT, se puede anticipar que el consumo crónico de BGAs no compromete la salud. En caso de que la exposición se aproxime al valor de la IDT, sería apropiado considerar también otras fuentes de exposición. De hecho, el consumo de productos contaminados, agua potable o pescado podría contribuir de manera significativa a superar el umbral de preocupación por el valor de la IDT y podría ser útil estimar el porcentaje de la ingestión total atribuible a BGAs (Funari y Testai, 2008).

En cuanto al empleo de AFA como base de productos BGAs disponibles comercialmente, se recolecta en su mayoría en el lago Klamath (Oregón, EE.UU.) donde crece de forma natural a altas densidades. Por lo tanto, existe la posibilidad de incluir otros organismos como cianobacterias productoras de toxinas en su recolección, en contraste con otras cianobacterias que se utilizan para el consumo humano tales como *Spirulina* (que generalmente se cultiva en estanques artificiales) (Carmichael y cols., 2000).

Diversas investigaciones han encontrado altos niveles de cianotoxinas en productos BGAs (Lawrence y Menard, 2001; Saker y cols., 2005), a veces incluso mayores que el valor guía provisional de 0,1 $\mu\text{g}/\text{g}$ p.s propuesto por la División de Salud y por el Departamento de Agricultura de Oregón, observándose una concentración máxima de 18,40 μg MC-LR eq/g de AFA (Gilroy y cols., 2000). Un nivel máximo inferior se ha observado en productos testados procedentes de Suiza de 4 μg MCs/g (MC-RR, -YR, -LR, -LA) (Ortelli y cols., 2008). Por otro lado, Vichi y cols. (2012) detectaron y cuantificaron niveles de MCs en una variedad de marcas de BGAs disponibles en herboristerías y otros negocios de Roma (Italia) usando LC-MS/MS en combinación con ELISA y PCR, obteniéndose 0,86 μg MCs/g como valor medio y 5,20 μg MCs/g como valor máximo (valor referido a la suma de MCs) (Tabla 2). Los productos de *Spirulina* analizados por estos mismos autores por el contrario mostraron niveles por debajo del límite de detección

Seis muestras de AFA evaluadas dieron positivo para la contaminación de MCs, con un rango de 0,4-2,2 $\mu\text{g}/\text{g}$ MC-LR, la mayoría también contenían trazas de MC-LA

siendo detectada por el test de inhibición de la fosfatasa alcalina (PPIA), ELISA y LC-MS/MS (sin mostrar diferencias significativas entre ellos) (Heussner y cols., 2012). Gracias a esta combinación de métodos no sólo se detecta la presencia de toxinas, sino que también permiten conocer la fuente de producción de las mismas (Vichi y cols., 2012). Sólo una publicación investigó el análisis de NODs en BGAs, demostrando que estas toxinas no se detectaron en 18 muestras de productos a base de AFA, *Spirulina* y *Chlorella* del mercado alemán por PPIA, ELISA and LC-MS/MS (Heussner y cols., 2012).

Tabla 1. Estudios referentes a BGAs de *Spirulina*

<i>Spirulina</i> , Valor Máximo (y rango medio)	Referencia y técnica analítica
2,12 µg MC-LR eq/g (0,15-0,52 µg MC-LR eq/g)	Gilroy y cols., 2000 (EE.UU.) ELISA
Por debajo del límite de detección: 0,0012-0,015 µg/g (suma de MCs, MC-RR, -YR, -LR, -LA)	Vichi y cols., 2012 (Italia) LC-MS/MS
Por debajo del límite de detección: 0,1 µg/g (suma de MCs, MC-RR, -YR, -LR, -LA)	Ortelli y cols., 2008 (Suiza) UPLC/MS
Rango medio: 0,047 µg MC-LR eq/g	Yu y cols., 2002 (Taiwan) ELISA
0,163 µg MCs/g (0,014 µg MCs/g)	Jiang y cols., 2008 (China) LC-MS/MS

Tabla 2. Estudios referentes a BGAs de AFA

AFA, Valor Máximo (y rango medio)	Referencia y técnica analítica
18,40 µg MC-LR eq/g (2,15-10,89 µg MC-LR eq/g)	Gilroy y cols., 2000 (EE.UU.) ELISA
5,20 µg MCs/g (0,86 µg MCs/g) (suma de MCs, MC-RR, -YR, -LR, -LA)	Vichi y cols., 2012 (Italia) LC-MS/MS
4 µg/g (suma de MCs, MC-RR, -YR, -LR, -LA)	Ortelli y cols., 2008 (Suiza) UPLC/MS
2,531 µg MC-LR eq/g	Vinogradova y cols., 2011 (Irlanda) SPR
Rango medio: 0,050 µg MC-LR eq/g	Yu y cols., 2002 (Taiwan) ELISA

Respecto a los BGAs de *Chlorella*, los niveles obtenidos van desde valores por debajo del límite de detección (0,01 µg/g) a 0,036 µg MC-LR eq/g en productos de Taiwan por ELISA (Yu y cols., 2002). Otro estudio realizado con productos de mercados alemanes y suecos demostró que 8 de cada 13 productos excedieron el límite propuesto de 0,1 µg/g (Hoeger y cols., 2004).

Antes del aumento general de la concienciación y de que las regulaciones empezasen a ser implantadas, se hallaron niveles de MCs en BGAs de hasta 35 µg/g (Gilroy y cols., 2000; Lawrence y Menard, 2001), con un porcentaje importante de muestras que alcanzaron niveles de MC-LR ≥ 1 µg/g p.s. (Dietrich y Hoeger, 2005; Saker

y cols., 2005). Cuando se secuenciaron dos genes del clúster MC sintetasa en muestras de BGAs, los resultados mostraron que *M. aeruginosa* era la fuente de contaminación (Saker y cols., 2005), sugiriendo que, aparte de *Spirulina* y AFA, se pueden obtener otras cianobacterias productoras de toxinas accidentalmente durante los procesos de recolección de la naturaleza (Funari y Testai, 2008). Los métodos químicos o bioquímicos tales como HPLC, ELISA y PPIA utilizados en estudios previos no proporcionan ninguna información sobre la fuente del contaminante, no se emplean para identificar sólo detectan la presencia de toxinas (Gilroy y cols., 2000). Saker y cols. (2005) proponen para el re-análisis de las muestras recolectadas en el estudio realizado por Health Canada (Lawrence y Menard, 2001) una técnica molecular que involucra la amplificación del gen 16s ARNr, el operón de la ficocianina y los dos genes del gen clúster de MC sintetasa. Con esta técnica se pudo demostrar que las 12 muestras de BGAs testadas, con diverso origen y que contenían AFA no tóxica, también presentaban cianobacterias toxigénicas. La presencia de MCs en BGAs se confirmó por ELISA, con concentraciones dentro del rango de 0,1-4,72 µg/g de BGAs por kg (equivalentes de MC-LR) (Saker y cols., 2005). La presencia de cepas toxigénicas de *Microcystis* en todos los suplementos alimenticios producidos a partir de la cianobacteria no tóxica AFA también fue demostrada por Saker y cols. (2007) usando la técnica MúltiplePCR.

El creciente interés en el uso de técnicas moleculares conduce a la identificación de los genes responsables de la producción de algunas otras toxinas de cianobacterias como CYN (Schembri y cols., 2001) y NOD (Moffitt y Neilan, 2001). Si se utilizan en combinación con otras técnicas químicas y bioquímicas tales como HPLC, ELISA y el PPIA, las técnicas moleculares podrían ser útiles para la rápida y sensible detección, monitorización y control de calidad de los productos destinados al consumo humano que contienen cianobacterias (Saker y cols., 2005). Además, para la industria, se podrían determinar así periodos de cultivo más seguros (Saker y cols., 2007; Vichi y cols., 2012). Por otro lado, también pueden usarse como “prescreening” para determinar qué muestras requieren una evaluación continua de toxinas, ayudando en las evaluaciones del riesgo para el establecimiento de concentraciones límite BGAs (Yakes y cols., 2015). No obstante, ninguno de los métodos ha sido aún validado

totalmente para el análisis de cianotoxinas en BGAs (Heussner y cols., 2012; Saker y cols., 2007), excepto el método de screening basado en biosensores SPR, que ha sido evaluado como método cuantitativo para la detección de MCs en agua y en BGAs (Yakes y cols., 2014).

En el "peor caso" de exposición, un adulto puede consumir diariamente 20 g de BGAs que estén contaminados con el mayor nivel de MC-LR hallado en estos productos (35 $\mu\text{g/g}$ p.s.), dando lugar a la ingestión de 700 $\mu\text{g/día}$ para un adulto de 70 kg, que sería 250 veces mayor a la IDT (2,8 $\mu\text{g/día}$ para un adulto de 70 kg). Este caso descrito implicaría una dosis tan alta que representaría también un efecto agudo. De hecho, haciendo referencia a la dosis aguda sin efecto (2,5 $\mu\text{g/kg}$ p.c.), un adulto estándar de 70 kg puede ingerir hasta 175 μg MCs sin experimentar efectos apreciables en su salud. Por lo tanto, la dosis ingerida (700 $\mu\text{g/día}$) sería lo suficientemente alta como para producir efectos agudos hepáticos significativos. En tal caso, el lote contaminado de BGAs debe ser inmediatamente retirado del mercado, ya que es imposible controlar su consumo individual. Asimismo, habría que dar indicaciones de reducción de la dosis. También se debe tener en cuenta el uso continuado durante 2 ó 3 meses (es decir, durante un régimen de dieta hipocalórica para perder peso), donde podría ser útil considerar la dosis de referencia aguda, que es 0,4 $\mu\text{g/kg}$ p.c./día para MC-LR, correspondiente a 28 $\mu\text{g/día}$ para un adulto de 70 kg. En este caso, el consumo sería 25 veces mayor que el umbral para un adulto de 70 kg (700 $\mu\text{g/día}$), y mucho mayor para los niños cuando se administran como tratamiento para el TDAH. De hecho, en esta etapa, teniendo en cuenta un menor peso corporal, incluso considerando un consumo reducido de BGAs, la ingesta de MCs puede tener como consecuencia un grave riesgo para su salud (Funari y Testai, 2008).

5. CONCLUSIONES

De lo anteriormente expuesto se puede concluir lo siguiente:

En conjunto, los hallazgos mencionados indican la necesidad de un control sistemático de la calidad y la evaluación de los BGAs disponibles en el mercado. Esto

puede, sin embargo, ser un serio desafío si se considera el gran número de diferentes fabricantes y las distintas vías de distribución, incluyendo las ventas on-line que están menos sujetas a control. Debido a la actual falta de reglamentación adecuada, la seguridad de los suplementos alimenticios reside en la investigación científica que parte de un programa de monitorización a fondo. Ante esta problemática se debería implantar una normativa más estricta formulando medidas a través de leyes internacionales y nacionales necesarias para preservar ambientes acuáticos así como la salud humana, que no sólo contemplen el consumo único sino también el crónico. Además, se debería incluir la implementación de planes de prevención, información y alerta sobre la toxicidad a consumidores y vendedores por parte de las autoridades así como su inclusión en el correspondiente etiquetado. La ausencia de advertencias de los productos de venta junto a las grandes campañas de publicidad y marketing que se están lanzando en los últimos años, destacando la reciente en la Exposición Internacional de Milán (2015) que portaba el eslogan «Alimentar el planeta, energía para la vida», les proporciona una falsa identidad de inocuidad, lo que atrae mayor consumo. De hecho, en esta última campaña se pretende usar la *Spirulina* para luchar contra la malnutrición escolar denominándose “el alimento de los dioses”.

Atendiendo a los resultados estudiados, los métodos de detección empleados resultan ser de gran utilidad como control de calidad. Cabe destacar la eficiencia en el uso de distintos métodos (técnicas analíticas y moleculares) en combinación, ya que no sólo se detecta la presencia de toxinas sino que también permiten conocer la fuente de producción de las mismas, resultando de gran importancia los métodos moleculares como pre-screening y clean-up inicial evitando posibles interferencias en técnicas analíticas usadas posteriormente.

Además, la información recogida en estos trabajos puede emplearse en alertar a los productores de los períodos en los que se debería incrementar la vigilancia sobre todo en productos obtenidos directamente del medio ambiente, así como la monitorización continua de agua, alimentos y BGAs. Y, lo más importante, la necesidad de controlar la eutrofización y, subsecuentemente, reducir la exposición a cianotoxinas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Atencio L, Moreno IM, Pichardo S, Jos A, Moyano R, Blanco A, et al. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in Tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to microcystins from toxic cyanobacterial blooms. *Toxicon*. 2008; 5: 1–12.
- Ballot A, Krienitz L, Kotut K, Wiegand C, Metcalf JS, Codd GA, et al. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya-Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. *J. Plankton Res.* 2004; 26: 925–935.
- Ballot A, Krienitz L, Kotut K, Wiegand C, Pflugmacher S. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae*. 2005; 4: 139–150.
- Belay A, Ota Y, Miyakawa K, Shimamatsu H. Production of high quality *Spirulina* at Earthrise Farms. In: Phang et al., eds. *Algal Biotechnology in Asia-Pacific Region*. University of Malaysia. 1994; 92-102
- Belay A. The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J. Am. Nutraceut. Assoc.* 2002; 5: 27–48.
- Bernard C, Froscio S, Campbell R, Monis P, Humpage A, Fabbro L. Novel toxic effects associated with a tropical *Limnothrix/Geitlerinema*-like cyanobacterium. *Environmental Toxicology*. 2011; 26(3): 260-70.
- Berry JP, Lind O. First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in “tegogolo” snails (*Pomacea patula catemacensis*). *Toxicon*. 2010; 55: 930–938.
- Bláhová L, Oravec M, Maršálek B, Šejnohová L, Šimek Z, Bláha L. The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. *Toxicon*. 2009; 53: 519–524.
- Briand JF, Jacquet S, Bernard C, Humbert JF. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet Res.* 2003; 34: 361–377.

- Burch MD. Effective doses, guidelines and regulations. Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. Advances in Experimental Medicine and Biology, H. Kenneth Hudnell (ed.); 2007. 36: 819-841.
- Carmichael, WW, 1998. Toxic microcystis and the environment. In: Watanabe, M.F., Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (Eds.). Toxic microcystis. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo; 1998. p. 1–11.
- Carmichael WW, Drapeau C, Anderson DM. 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.
- Carmichael WW, Azevedo SM, An JS, Molica RJ, Jochimsen EM, Lau S, et al. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. Environ. Health Perspect. 2001; 39: 341-344.
- Carmichael WW and Falconer IR. Diseases related to freshwater algal blooms. In:Falconer IR (ed.) Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Academic Press, London; 1993. p. 187-209
- Chatziefthimiou AD, Metcalf JS, Glover WB, Banack SA, Dargham SR, Richer RA. Cyanobacteria and cyanotoxins are present in drinking water impoundments and groundwater wells in desert environments. *Toxicon*. 2016; 114: 75-84.
- Chen J, Xie P, Li L, Xu J. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicol. Sci*. 2009; 108: 81–89
- Chorus I, Bartram J. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E & FN Spon. London: New York; 1999.
- Chorus I. Cyanotoxins - Occurrence, Causes, Consequences. Berlin: Springer-Verlag; 2001.
- Corbel S, Mougin C, Bouaicha N. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere*. 2014.

- Dietrich D, Hoeger S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach?. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005; 203: 273–289.
- Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Ong CN. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environ. Res. A*. 1998; 78: 12–18.
- Dittmann E and Börner T. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005; 203: 192–200.
- Dittmann E and Wiegand C. Cyanobacterial toxins-occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006; 50: 7–17.
- Doyle ME. Toxins from cyanobacteria. Food Research Institute University of Wisconsin–Madison Madison WI 5370. 2011.
- Draisci R, Ferretti E, Palleschi L, Marchiafava C. Identification of anatoxins in blue-green algae food supplements using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 2001; 18: 525–531.
- Falconer IR, Hardy SJ, Humpage AR, Froschio SM, Tozer GJ, Hawkins PR. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. *Environmental Toxicology*. 1999; 14(1), 143-150.
- Federal Trade Commission. 2001. Dietary Supplements: An Advertising Guide for Industry. Federal Trade Commission, U.S., Bureau of Consumer Protection. <http://business.ftc.gov/documents/bus09-dietary-supplements-advertising-guide-industry> [Apr. 2001].
- Funari E and Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 2008; 38: 97–125.
- Gehring MM. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett.* 2004; 557(1-3): 1-8.

- 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 (5): 435–439.
- Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos A, Cameán AM. Toxicity and glutathione implication in the effects observed by exposure of the liver fish cell line PLHC-1 to pure cylindrospermopsin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2011a; 74: 1567– 1572.
- Gutiérrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Moreno IM, Cameán AM, 2013. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food and Chemical Toxicology*; 2013; 53: 139–152.
- Guzman-Guillen R, Moreno I, Prieto Ortega AI, Soria-Diaz ME, Vasconcelos V and Camean AM. CYN determination in tissues from freshwater fish by LC-MS/MS: Validation and application in tissues from subchronically exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Talanta.* 2015; 131: 452-459.
- Harada K, Tsuji K, Watanabe MF, Kondo F. Stability of microcystins from cyanobacteria—III. Effect of pH and temperature. *Phycologia.* 1996; 35: 83–88.
- Heussner AH, Mazija L, Fastner J, Dietrich DR. Toxin content and cytotoxicity of algal dietary supplements. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 265: 263–271.
- Hoeger SJ, Shaw G, Hitzfeld BC, Dietrich DR. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants. *Toxicon.* 2004; 43: 639–649
- Hoseini SM, Khosravi-Darani K, Mozafari MR: Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae. *Mini Rev Med Chem.* 2013; 13: 1231-1237.
- Humpage AR and Falconer IR. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ. Toxicol.* 2003; 18: 94–103.

- Humpage AR, Fontaine F, Frosco S, Burcham P, Falconer IR. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2005; 68: 739–753.
- IARC. 2006. Monographs volume 94. Available at <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/94-cyanobacterial.pdf>
- Ibelings BW, Chorus I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: a review. *Environ. Pollut.* 2007; 150: 177–192.
- Jiang Y, Xie P, Chen J, Liang G. Detection of the hepatotoxic microcystins in 36 kinds of cyanobacteria *Spirulina* food products in China. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 2008; 25 (7): 885–894.
- Jochimsen EM, Carmichael WW, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CE, Antunes MB, et al. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*. 1998; 338(13): 873-8.
- Jos A, Pichardo S, Prieto AI, Repetto G, Vazquez CM, Moreno IM, et al. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 2005; 72: 261–271.
- Knubel, G, Larsen, LK, Moore, RE, Levine IA, Patterson GM. Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue–green alga belonging to the *Nostocaceae*. *J. Antibiot. (Tokio)*. 2012; 43: 1236–1239.
- Kurmayer R, Dittman E, Fastner J and Chorus I. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Mycrocystis* spp. in lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb. Ecol.* 2002; 43: 107–118.
- Lawrence JF and Menard C. Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography. *Journal of chromatography*. 2001; 922: 111-117.

- Marles RJ, Barrett ML, Barnes J, Chavez ML, Gardiner P, Ko R, et al. United States pharmacopeia safety evaluation of *Spirulina*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2011; 51: 593–604.
- Martelli G, Folli C, Visai L, Daglia M, Ferrari D. Thermal stability *platensis* for food industry applications. *Process Biochem.* 2014; 49: 154-159.
- Moffitt, M.C., and Neilan, B.A. On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001; 196: 207–214.
- Nong Q, Komatsu M, Izumo K, Indo HP, Xu B, Aoyama K, et al. Involvement of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced cytogenotoxicity. *Free. Radical Res.* 2007; 41: 1326–1337.
- Ohtani I, Moore RE, Runnegar MT. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green algae *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 1992; 114: 7941–7942.
- O’Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae.* 2012; 14: 313–334.
- Ortelli D, Edder P, Cognard E, Jan P. Fast screening and quantitation of microcystins in microalgae dietary supplement products and water by liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Analytica chimica acta* 2008; 617: 230-237.
- Pearson LA and Neilan BA. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008; 19: 281-288.
- Pérez S and Aga DS. Recent advances in the sample preparation liquid chromatography tandem mass spectrometric analysis and environmental fate of microcystins in water. *Trends in Analytical Chemistry*; 2005; 24 (7): 658-670.

- Pichardo S, Jos A, Zurita JL, Salguero M, Camean AM, Repetto G. Acute and subacute toxic effects produced by microcystin-YR on the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1. *Toxicol. In Vitro*. 2007; 21: 1460–1467.
- Puerto M, Pichardo S, Jos A, Camean AM. Comparison of the toxicity induced by microcystin-RR and microcystin-YR in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Toxicon*. 2009b; 54: 161–169.
- Puerto M, Pichardo S, Jos A, Camean AM. Oxidative stress induced by microcystin-LR in the PLHC-1 fish cell line. *Toxicol. In Vitro*. 2009c; 23: 1445–1449.
- Puerto M, Pichardo S, Jos A, Camean, AM. Microcystin-LR induces toxic effects in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Arch. Toxicol*. 2010; 84: 405–410.
- Quesada A, Moreno E, Carrasco D, Paniagua T, Wormer L, de Hoyos C, et al. Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. *Eur. J. Phycol*. 2006; 41: 39–45.
- Ramírez GP, Martínez RE, Martínez SMD, Eslava CC. Cianobacterias, microorganismos del fitoplacton y su relación con la salud humana, *Instituto Nacional de Ecología*. 2004; p. 1-18.
- Rapala J, Sivonen K, Luukkainen R, Niemela S. Anatoxin-a concentration *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.
- Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ, Ge JL, Lu SC. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid *Cylindrospermopsin* in cultured rat hepatocytes. *Biomed. Biophys. Res. Commun*. 1994; 201: 235–241.
- Rzymiski P, Poniedziałek B, Niedzielski P, Tabaczewski P, Wiktorowicz K. Cadmium and lead toxicity and bioaccumulation in *Microcystis aeruginosa*. *Front. Environ. Sci. Eng*. 2014a; 8: 427–433.

- Rzymiski P, Niedzielski P, Poniedziałek B, Karczewski J. Biosorption of toxic metals using freely suspended *Microcystis aeruginosa* biomass. *Centr. Eur. J. Chem.* 2014b; 12: 1232–1238.
- Saker ML, Jungblut AD, Neilan BA, Rawn DF, Vasconcelos VM. Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon.* 2005; 46: 555-562.
- 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 (5): 1136–1142.
- Schembri MA, Neilan BA and Saint CP. Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* 2001; 16: 413-421.
- Seawright AA, Nolan CC, Shaw GR, Chiswell RK, Norris RL, Moore MR, et al. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (*Woloszynska*). *Environ. Toxicol.* 1999; 14: 135–142.
- Song KY, Lim IK, Park SC, Lee SO, Park HS, Choi YK, Hyun BH. Effect of nodularin on the expression of glutathione S-transferase placental form and proliferating cell nuclear antigen in N-nitrosodiethylamine initiated hepatocarcinogenesis in the male Fischer 344 rat. *Carcinogenesis.* 1999; 20(8): 1541-1548.
- Terao K, Ohmori S, Igarashi K, Ohtani I, Watanabe MF, Harada KI, et al. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon.* 1994; 32: 833–843.
- Testai E, Buratti FM, Funari E, Manganelli M, Vichi S, Arnich N, et al. Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. *EFSA Supporting Publication.* 2016; 13(2).
- Van Apeldoorn ME, Van Egmond HP, Speijers GJ, Bakker GJ. Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007; 51: 7–60.
- 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 and Chemical Toxicology*. 2012; 50: 4493-9.

-Vinogradova T, Danaher M, Baxter A, Moloney M, Victory D and Haughey SA. Rapid surface plasmon resonance immunobiosensor assay for microcystin toxins in blue-green algae food supplements. *Talanta*. 2011; 84(3): 638-643

-Wimmer KM, Strangman WK, Wright JLC. 7-Deoxy-desulfo-cylindrospermopsin and 7-deoxy-desulfo-12-acetylcylindrospermopsin: Two new cylindrospermopsin analogs isolated from a Thai strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful algae*. 2014; 37: 203-206.

-Wood R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure— A review of the literature. *Environ Int*. 2016 May; 91: 276-82

-WHO, 1998. Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR. Guidelines for Drinking-Water Quality. World Health Organization, Geneva, p. 95–110.

-WHO, 2006. Guidelines for drinking-water quality, third edition, incorporating first addendum.

http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/index.html.

-Wu J, Shao S, Zhou F, Wen S, Chen F, Han X. Reproductive toxicity on female mice induced by microcystin-LR. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014; 37(1): 1-6.

-Yang Y, Park Y, Cassada D, Snow D, Rogers D, Lee J. In vitro and in vivo safety assessment of edible blue-green algae, *Nostoc commune* var. *sphaeroides* Kützing and *Spirulina plantensis*. *Food Chem. Toxicol*. 2011; 49: 1560–1564.

-Yakes BJ, Kanyuck KM, DeGrasse SL. First report of a direct surface plasmon resonance immunosensor for a small molecule seafood toxin. *Anal. Chem*. 2014; 86 (18): 9251–9255.

-Yakes BJ, Handy SM, Kanyuck KM, DeGrasse SL. Improved screening of microcystin genes and toxins in blue-green algal dietary supplements with PCR and a surface plasmon resonance biosensor. *Harmful Algae*. 2015; 47: 9.

- Yilmaz M, Philips EJ, Szabo NJ, Badylak S. A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. *Toxicon*. 2008; 51: 130-139

- Yoshizawa S, Matsushima R, Watanabe MF, Harada KI, Ichihara A, Carmichael WW, et al. Inhibition of protein phosphatases by microcystis and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1990; 116(6): 609-614.

- Yu FY, Chu FS, Chou HN, Liu BH. Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002; 50: 4176-4182.

- Zegura B, Straser A, Filipic M, 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review. *Mutat. Res*. 2011; 727: 16–41.

- Zhang H, Zhang J, Chen Y, Zhu Y. Microcystin-RR induces apoptosis in fish lymphocytes by generating reactive oxygen species and causing mitochondrial damage. *Fish. Physiol. Biochem*. 2008; 34: 307–312.