



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Revisión del estado
actual de la
problemática y de los
métodos de análisis
para determinación de
metales pesados en
espirulina.**

Alumna: María del Mar Guardia Alcántara

Junio, 2018



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales
Grado en Química

Trabajo Fin de Grado

**REVISIÓN DEL ESTADO ACTUAL
DE LA PROBLEMÁTICA Y DE LOS
MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA
DETERMINACIÓN DE METALES
PESADOS EN ESPIRULINA.**

Alumna: María del Mar Guardia Alcántara

Jaén, Julio 2018

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. <i>Espirulina platensis</i>	3
1.1.1 <i>Concepto y estructura de la Espirulina platensis</i>	3
1.1.2 <i>Composición química</i>	4
1.1.3 <i>Propiedades y aplicaciones</i>	7
1.2. Antecedentes y redescubrimiento de la espirulina. Producción en distintos lugares.....	9
1.3. Metales pesados.....	10
1.4. Legislación.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. METODOLOGÍA.....	19
4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	20
5. REVISIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE METALES PESADOS EN ESPIRULINA.....	23
5.1. Toma de muestra y pretratamiento.....	23
5.2. Tratamiento de muestra.....	24
5.3. Técnicas de detección.....	31
5.4. Comparativa de los distintos métodos de análisis de metales pesados.....	36
5.5. Aplicaciones analíticas.....	38
6. CONCLUSIONES.....	43
7. BIBLIOGRAFÍA.....	45

RESUMEN

La espirulina es una microalga del tipo cianobacteria caracterizada por su alta concentración en micronutrientes y macronutrientes.

Se considera el alimento del futuro debido a su extraordinario contenido nutricional y sus múltiples propiedades beneficiosas para la salud. Esta alga se compone de vitaminas, ácidos grasos, minerales, carbohidratos, ácidos nucleicos, pigmentos y, sobre todo, de un alto porcentaje de proteínas.

Dependiendo de las condiciones ambientales y del entorno en el que crezca, puede contener diferentes concentraciones de metales pesados, debido a que la espirulina tiene un gran poder absorbente. Por lo tanto, es necesario disponer de métodos de análisis eficaces para asegurar que el consumo de esta alga es seguro. Por ese motivo, en este Trabajo Fin de Grado se lleva a cabo una revisión de los métodos de análisis para la determinación de metales en espirulina.

ABSTRACT

Spirulin is a microalga from the cyanobacteria family. Its main characteristic is its high concentration of micronutrients and macronutrients.

It is considered the food of the future due to its extraordinary nutritional content and its multiple healthy properties. This alga presents in its composition different vitamins, fatty acids, minerals, carbohydrates, nucleic acids, pigments and, particularly, a high content in proteins.

Depending on environmental conditions and the place where it grows, spirulin has different concentrations of heavy metals, due to its high absorption potential. Hence, it is important to have at hand suitable analytical methods to ensure the safe consumption of this alga. In this Bachelor Thesis, the analytical methods available for the determination of metals in spirulin have been reviewed.

1. INTRODUCCIÓN.

Las microalgas son microorganismos de distintas formas y tamaños, que están capacitados para sobrevivir en distintos hábitats. Además, se encuentran en el medio acuático con gran diversidad de especies de las cuales son el sustento primario de la cadena alimentaria. Estos seres sintetizan nueva materia orgánica a partir de sustratos inorgánicos; es por ello que reciben elevados rendimientos de biomasa con gran valor nutritivo.

La fotosíntesis es el proceso que realizan las plantas y cianobacterias donde las moléculas inorgánicas se convierten en materia orgánica y, a su vez, la energía solar se transforma en energía química (*ver figura 1.1*) [Margaleff, 1977].

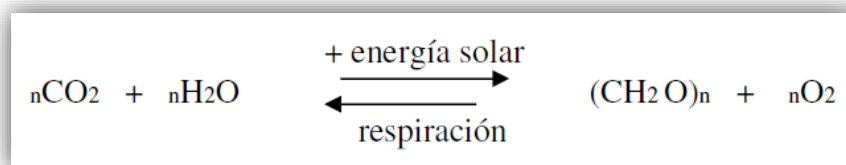


Figura 1.1. Proceso de fotosíntesis de las cianobacterias.

En el ámbito de las microalgas más analizadas en biotecnología aparecen las cianobacterias, caracterizadas por su origen procariota con propiedades fisiológicas y morfológicas determinadas que les capacita a adaptarse a cambios ambientales extremos [Liotenberg *et al.*, 1996; Helbling *et al.*, 2006].

El desarrollo de las cianobacterias en medio acuático se encuentra establecido por varios criterios ambientales y para su cultivo se necesitan condiciones óptimas. Para crear biomasa requiere de elementos inorgánicos en su actividad nutricional como nitrógeno, oxígeno, carbono, hidrógeno, fósforo y azufre, los cuales participan en la formación de carbohidratos, grasas y proteínas [Rodríguez & Triana, 2006].

1.1. *Espirulina platensis*

1.1.1 Concepto y estructura de la *Spirulina platensis*

El nombre del alga espirulina deriva de la naturaleza espiral de sus filamentos. Además, se trata de una cianobacteria microscópica azul-verdosa, donde el color azul procede de la ficocianina presente y el verde de la clorofila. Se ha convertido en objeto de estudio científico debido a su biodisponibilidad de nutrientes, ya que entre el 85-95% son asimilables [M. Sánchez, Bernal-castillo, Rozo, & Rodríguez, n.d.; Al-Homaidan, 2006; Jocelyne et al., 2016] (ver figura 1.2).

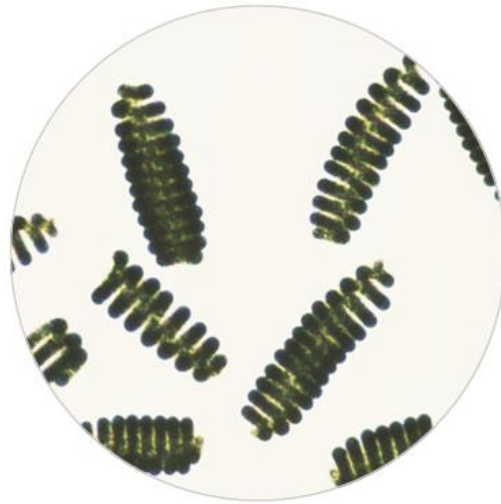


Figura 1.2. Estructura en espiral de la espirulina.

El género espirulina pertenece a la variedad *Arthrospira* y, ésta a su vez, a la familia *Oscillatoriaceae*. Entre sus peculiaridades se encuentran sus filamentos que adoptan formas espirales en hélice abierta (tricomos). El género *Arthrospira* es un tipo de cianobacteria de carácter multicelular, con células cilíndricas y una membrana plasmática que se encuentra rodeada por una pared celular pluriestratificada que presenta una serie de poros alrededor del tricoma, ésta a su vez envuelta por una cápsula o vaina compuesta de polisacáridos [Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006]. La pared celular no tiene celulosa dura, sino que está formada por mucopolisacáridos blandos lo cual facilita la asimilación de nutrientes.

Las dos especies más estudiadas son *Arthrospira* máxima y *Arthrospira* platensis, las cuales tienen diferencias en su composición y morfología. En relación a la cianobacteria *Arthrospira* presenta forma filamentosa y destaca por su carácter helicoidal con una dimensión entre 200 y 250 μm [Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006].

Aunque también son cultivadas, este tipo de microalgas crece de forma natural en aguas cálidas, dulces y alcalinas, muy ricas en minerales. Es un organismo mixotrófico, es decir, crece tanto por procesos autótrofos como heterótrofos utilizando el carbono obtenido de compuestos orgánicos y CO_2 . El entorno en el que prolifere determina gran parte de su composición química. También es importante la forma de reproducción ya que las células dispuestas en filamentos son capaces de multiplicarse por bipartición donde el proceso se resume en tres etapas: fragmentación de tricomas, maduración de células y alargamiento del tricoma [Rodríguez & Triana, 2006].

1.1.2 Composición química

Esta especie ha sido objeto de estudio desde hace muchos años, en especial su análisis químico ya que es una extraordinaria fuente de proteínas, minerales y vitaminas, además de otros componentes. Aunque esta microalga es capaz de crecer superando cambios ambientales extremos, su composición depende en gran parte de unos parámetros que hay que considerar en el entorno de cultivo, es decir, la influencia de factores ambientales como la luz, la temperatura, el pH o la disponibilidad de CO_2 son críticos para su producción.

La espirulina, con un porcentaje de proteína bruta entre 60-70%, es el microorganismo más prometedor [M. Sánchez, Bernal-castillo, Roza, & Rodríguez, 2003]. Igualmente la eficiencia, el valor biológico y la digestibilidad hacen de este alga el alimento con mayor proporción de proteína asimilable. Este hecho está relacionado con la calidad de los aminoácidos, los cuales en mayor proporción se encuentran la leucina (5.9-6.5%), valina (7.5%), isoleucina (6.8%) y ácido glutámico (7.3-9.5%) [Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006], aunque hay más aminoácidos en menor proporción como se muestra en la *Tabla 1.1*.

Tabla 1.1. Composición proteica de espirulina.

Proteínas	Contenido (%)
Ácido glutámico	7.3 - 9.5
Valina	7.5
Isoleucina	6.8
Leucina	5.9 – 6.5
Ácido aspártico	5.2 – 6.0
Tirosina	2.6 – 3.3
Lisina	2.6 – 3.3
Fenilalanina	2.6 – 3.3
Metionina	1.3 – 2.0
Triptófano	1.0 – 1.6
Cisteína	0.5 – 0.7

En relación a las vitaminas, la espirulina es rica en β -carotenos (provitamina A), en vitamina E y en vitamina B, ya que todas las del complejo B se encuentran presentes, además de otras muchas vitaminas. Los lípidos son los ácidos grasos esenciales y se encuentran entre 3-6.5% del total; mientras que el que se encuentra en mayor proporción es el ácido palmítico, el más importante es el ácido γ -linoleico, más conocido como GLA, por sus propiedades medicinales y dificultad de localizar en alimentos (*ver Tabla 1.2*).

Tabla 1.2. Composición de los ácidos grasos en la espirulina.

Ácidos grasos	Contenido (%)
Ácido palmítico	44.6 – 54.1
GLA	8 – 32
Ácido linoleico	11 – 31
Ácido oleico	1 – 15.5
Ácido palmitoleico	1.26
Ácido mirístico	0.23
Otros	20.88

En general, los minerales son bien asimilables por este tipo de organismos y forman parte del 7% del contenido químico [Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006; M. Sánchez et al., n.d.; N. Sánchez, Bu, León, & Pérez-Saad, 2002]; entre ellos se encuentran el potasio, sodio, fósforo o calcio (*ver Tabla 1.3*).

Tabla 1.3. Composición mineral de espirulina.

Minerales	Contenido %
Potasio	1-14
Sodio	0.45-0.5
Fósforo	0.3-0.7
Calcio	0.1-0.4
Magnesio	0.1-0.2
Hierro	0.03-0.05
Manganeso	0.005
Zinc	0.003
Cobre	0.0012

En el crecimiento de la espirulina es muy importante la calidad del agua puesto que puede llegar a producirse contaminación por metales pesados en el caso de que el agua contenga dichos metales, que llegarían a ser absorbidas por las algas. Entre los carbohidratos se pueden encontrar glucosa, ramnosa o galactosa, además de otros muchos formando parte entre 15-20% de la composición total de la espirulina (*ver Tabla 1.4*). El pigmento que se encuentra en mayor proporción en la espirulina es la ficocianina; también hay clorofila a y diversos tipos de carotenoides. Todas las cifras plasmadas en las Tablas 1.1-1.4 hacen referencia al tanto por ciento del peso seco de la biomasa [Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006].

Tabla 1.4. Composición de carbohidratos de espirulina.

Hidratos de Carbon	Contenido (%)
Ramnosa	17.1
Galactosa	8.2
Ribosa	8.1
Glucosa	7.5
Glicerol	7.4
Xilosa	4.5
Fucosa	3.3
D-Glucosamina	2.12
Manosa	1.9
No identificados	2.6

1.1.3 Propiedades y aplicaciones

La gran importancia que tiene el alga espirulina no sólo se debe a las múltiples propiedades beneficiosas que presenta, sino que además se obtienen aplicaciones muy interesantes a nivel industrial y medicinal. Entre sus utilidades, de su producción se espera una alternativa barata y eficiente para combatir el hambre en el mundo, aumentar niveles de energía o rendimiento de atletas, enriqueciendo nutricionalmente productos alimenticios o con la elaboración de suplementos dietéticos comercializados usualmente en polvo, tabletas y encapsulados [Al-Homaidan, 2006; Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006]. Esto se debe a que su fabricación es relativamente sencilla y se obtienen altos valores nutricionales, lo cual convierte a la espirulina en un superalimento; éstos forman parte de una categoría particular que se localiza en la naturaleza y que, en pequeñas cantidades, son enormemente ricos en nutrientes. También es empleada como alternativa a aditivos sintéticos en alimentos que poseen actividades promotoras de carcinogénesis, es decir, se emplea para evitar el uso de aditivos sintéticos que pueden causar cáncer [Herrero, Martín-Álvarez, Señoráns, Cifuentes, & Ibáñez, 2005; Jaime et al., 2005] o como colorante natural en la industria alimentaria. Debido a la cantidad de pigmentos que posee este microorganismo, no tóxico con alta solubilidad en agua y alta disponibilidad [Forbes, García, Armas, & Alimentaria, 2015; Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006].

Los carotenoides son antioxidantes que se adquieren en el organismo a través de la dieta; además, son los encargados de dar color a las plantas. Estos

compuestos son de gran interés ya que gracias a su carácter antioxidante pueden ayudar a la protección contra el cáncer y otras importantes aplicaciones en la salud humana [Herrero et al., 2005; Klejdus, Kopecký, Benešová, & Vacek, 2009].

Numerosas investigaciones acerca de la *Spirulina platensis* revelaron que tanto este alga como sus extractos pueden poseer ventajas fisiológicas tales como características antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales o antivirales [Jaime et al., 2005]. Todos los efectos beneficiosos que produce a nivel medicinal son gracias a sus componentes, los cuales no tienen efectos secundarios ni crean dependencia. Hay que destacar que esta microalga posee ácido γ -linoleico, más bien conocido como GLA, ya que es un ácido graso insaturado esencial muy difícil de encontrar en la dieta y genera prostaglandinas que ayudan a la disminución del colesterol en sangre. Por otra parte, la variedad de constituyentes que tiene actúan sobre estructuras del sistema nervioso y puede ser un medio de prevención y tratamiento de desórdenes neuropáticos [N. Sánchez et al., 2002].

Es necesario mencionar la importancia de la espirulina en la alimentación acuícola, debido a que los pigmentos como la clorofila a, β -caroteno, ficocianina y otros, mejoran la calidad y coloración del pez, crustáceos y moluscos. También en piensos para ciertos animales como aves se utiliza para intensificar el color de las plumas [Al-Homaidan, 2006; Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006], además de asegurar una buena nutrición.

La disponibilidad y calidad del agua se ve perjudicada debido al desarrollo y avances en la sociedad, pero gracias a que la espirulina tiene la capacidad de acumular metales, se utiliza en el tratamiento de aguas residuales. De esta manera elimina nitrógeno, fósforo y otros metales pesados del agua, generando así biomasa que se utiliza en el ámbito industrial. Esta propiedad de almacenar metales tiene a su vez una desventaja y es que esta capacidad para acumular metales implica que su presencia en el medio donde se cultive puede suponer que no sea apta para consumo. Por esto, es importante que cumpla ciertos requisitos de calidad para comercializarse [Al-Homaidan, 2006].

1.2. Antecedentes y redescubrimiento de la espirulina. Producción en distintos lugares

Los antiguos habitantes de numerosas ciudades consiguieron sobrevivir gracias a una ingesta saludable y proporcional de nutrientes que se fundamentaban en vegetales y algas, como el alga espirulina que se consumía frecuentemente ya que aportaba gran cantidad de energía. Ésta se cosechaba normalmente en época de lluvias, se recolectaba, filtraba el agua y se dejaba secar al sol; lo que quedaba era uno de los componentes de muchos de los platos que se cocinaban entonces.

Los antecedentes históricos confirman que el alga fue un ingrediente usual en la alimentación de muchos pueblos, es por esto que con el paso del tiempo se han hecho investigaciones que demuestran un alto potencial. El redescubrimiento de la espirulina ha ocasionado otro punto de vista más para solucionar muchos de los problemas de hoy en día, como por ejemplo la posibilidad de combatir el hambre en el mundo gracias a un alimento altamente rico en nutrientes, de bajo costo y fácil producción. Es por esta razón por lo que se han desarrollado trabajos de investigación sobre usos, técnicas de producción y aplicaciones.

Actualmente la espirulina crece de forma natural en numerosos lugares de todo el mundo, principalmente en lagos de África, como en Kenia, Etiopía, Egipto, Sudán, Argelia, Congo, Zaire y Zambia; también se encuentra en Asia tropical y subtropical como en India, Myanmar, Pakistán, Sri Lanka, China, Tailandia y Rusia; en diferentes ubicaciones de América entre los que destacan Perú, Uruguay y California; y por último mencionar en Europa países como España, Francia, Hungría y Azerbaiján, aunque los principales productores fueron México, Kanem y Chad. Todos estos lugares tienen en común las condiciones idóneas para que crezcan estas algas. También puede ser sintetizada donde se cultiva en los Estados Unidos, Hawai, Tailandia, Taiwán, Chile, Vietnam, India, Japón, Cuba, España, Argentina, México y otros países [Al-dhabi, 2013] y existen algunas compañías productoras de Spirulina, donde su cultivo se lleva a cabo de manera intensiva dentro de estanques artificiales. La biomasa obtenida se deshidrata y pulveriza para fabricar comprimidos o encapsulados que se venden como suplementos [M. Sánchez et al., 2003].

Las principales compañías productoras se sitúan en el continente asiático. La India entorno a los años 1994-1996 generó productos a base de espirulina donde el 95% de su producción era polvo y el 5% se comercializaba en forma de

comprimidos. A su vez, en ese mismo período de tiempo Myanmar se dedicaba a las ventas locales de espirulina y comprimidos gracias a empresas como Myanmar Microalga. Por otro lado, Estados Unidos entre los años 1994-2002 también se dedicaba a la explotación de esta alga en productos pulverizados, tabletas, alimentos e incluso como espirulina para diagnósticos inmunológicos. Por esas mismas fechas, otras empresas tailandesas vendían esta alga en polvo en un 30% de su producción, y para consumo humano y animal en un 70%. A esta lista se suma sólo en el año 1995 China y Taiwán, con empresas productoras de alimentos elaborados a base de espirulina. En el año 2000 una empresa chilena denominada Solarium también se dedicó a la venta pero en este caso también se comercializaba con la espirulina fresca. Queda mencionar países como Cuba o Argentina, sobre los años 2001 o 2002, que también vendían suplementos nutricionales, cosméticos y variedad en productos medicinales.

Cabe destacar que hoy en día son abundantes las empresas que se dedican a la comercialización de la espirulina, muchas de ellas españolas, esto ha sido gracias a todas las investigaciones que han proporcionado información y han demostrado el increíble potencial que tiene esta alga.

1.3. Metales pesados

La globalización ha ocasionado la entrada de nuevos alimentos en la dieta de los seres humanos. Entre estos nuevos alimentos, se encuentran las algas, que son capaces de almacenar elementos tóxicos, por lo que es muy importante llevar a cabo controles rutinarios de calidad, empleando técnicas analíticas fiables y sensibles.

Numerosos estudios acerca de la toxicidad de la espirulina resaltan la posibilidad de existir tóxicos biológicos y no biológicos, como por ejemplo metales o compuestos orgánicos perjudiciales. Dependiendo del medio de cultivo, la composición puede variar. De hecho, en diversas investigaciones se ha evaluado el impacto de la temperatura, el pH y la salinidad sobre el crecimiento y la calidad proteica del alga [Al-Homaidan, 2006].

Los metales pesados forman parte de un grupo de elementos químicos con propiedades metálicas y que se encuentran en la naturaleza en bajas proporciones, aunque pueden verse incrementados por actividades antrópicas como la producción

de solventes orgánicos, combustibles o pesticidas. Este aumento de contaminación por metales pesados se está viendo reflejado en problemas importantes y actuales en la salud.

Muchos de estos elementos son una amenaza real ya que no pueden ser degradados ni biológica ni químicamente y perduran en el tiempo siendo perjudiciales para el medio ambiente además de conservarse a través de la cadena alimenticia, como es el caso del Cd o As, que son elementos traza considerados tóxicos [Ahmad, Ghufraan, & Wahid, 2010; Campanella, Crescentini, Avino, & Moauro, 1998]. En la Tabla 1.5 se resumen los daños que pueden causar sobre la salud los principales metales que se pueden encontrar en los alimentos por EFSA (la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)

El arsénico es un metaloide con cuatro estados de oxidación, lo que genera una gran cantidad de compuestos con características físicas y químicas muy diferentes, donde los efectos más desfavorables se observan debido al As (III), más tóxico que el As (V). Una intoxicación aguda tras la ingesta por vía oral de este metal incluye diarrea, dolores gastrointestinales, vómitos, calambres musculares, alteraciones cardíacas o en el sistema nervioso central, aumento de la irritabilidad y pérdida de peso, mientras que la exposición crónica genera dilataciones de capilares cutáneos, hipo e hiperpigmentación, alteraciones gangrenosas, neuropatías periféricas, encefalopatía, alteración del metabolismo, depresión de la médula ósea, diabetes y deterioro de la función renal (conocida como necrosis). Además, la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) ha calificado al As inorgánico en el grupo I, es decir, cancerígeno humano.

Por otro lado, el cadmio es un contaminante ambiental cuyas fuentes derivan del medio natural, de la industria (por ríos contaminados) y de la agricultura (por fertilizantes). A causa de su gran capacidad de transmisión del agua-suelo-plantas, el Cd es un contaminante peligroso y presente en gran cantidad de alimentos aptos para consumo humano. En aguas contaminadas, las sales de cadmio se tienen muy en cuenta debido a la alta toxicidad que presenta, además por su habilidad para absorberse en los alimentos, las plantas acuáticas y organismos mediante mecanismos de bioacumulación y biomagnificación [Beltrán & Gómez, 2015]. La absorción de este metal mediante la dieta hace que el Cd se almacene en el riñón e hígado; además puede ocasionar desmineralización ósea y en este caso, la IARC

también ha clasificado al Cd como carcinógeno para el ser humano en el grupo I. Los síntomas por toxicidad aguda suelen ser dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea, dolor de cabeza, mientras que la toxicidad crónica se encuentra asociada a síntomas tales como alteraciones respiratorias y cardiovasculares, disfunción renal, desórdenes en el metabolismo del calcio, neurotoxicidad y enfermedades óseas tales como osteoporosis y fracturas óseas espontáneas.

El mercurio (Hg) es otro de los elementos que se considera bastante peligroso y su toxicidad depende de su forma química, tipo y exposición (*ver Tabla 1.5*). Existen muchas formas de encontrar este metal en los alimentos, pero la manera más usual es el compuesto orgánico metil mercurio (Me-Hg), que además es el que muestra mayor peligro puesto que tiene la gran capacidad de acumularse en membranas biológicas y puede atravesar fácilmente membranas [Beltrán & Gómez, 2015]. Su ingesta perjudica en su mayor parte a los riñones y al Sistema Nervioso Central, aunque también se ha asociado a neurotoxicidad y nefrotoxicidad.

Otro de los metales pesados más perjudiciales y estudiados es el plomo ya que es un contaminante presente en el medioambiente de forma natural o como resultado de actividades humanas. Así pues puede encontrarse en forma orgánica e inorgánica, almacenándose en los suelos y las aguas superficiales. Cuando los humanos sufren una ingesta de Pb, pueden producirse impactos tóxicos sobre el organismo, donde el Sistema Nervioso Central es el principal órgano afectado. La absorción del Pb inorgánico por vía oral hace que el hierro sea deficiente asociado a un incremento de la concentración de este metal en sangre. La toxicidad crónica debida a este metal pesado es importante debido a la vida media del Pb en el organismo, siendo los riñones los órganos más sensibles a la exposición.

La contaminación por metales pesados en el agua es un problema ambiental importante que necesita un remedio eficaz, de ahí que la fitorremediación haya sido estudiada estos últimos años. Ésta es una técnica que utiliza la capacidad de algunas plantas de absorber, acumular o estabilizar la concentración de contaminantes en agua y otros medios, pudiendo eliminar de este modo metales pesados. También existen numerosos métodos de tratamiento para excluir estos tóxicos del agua como por ejemplo la adsorción de carbón activado, intercambio iónico, coagulación, electrocoagulación y otros procesos biológicos, pero no suelen

salir rentables [Ahmad et al., 2010; Rangsayatorn, Pokethitiyook, Upatham, & Lanza, 2004].

Cu y Zn son elementos esenciales para las plantas pero en proporciones altas son tóxicos, al igual que el Cr y Se son necesarios para el cuerpo humano pero se vuelven peligrosos en ingestas excesivas [Campanella et al., 1998]. El As es absorbido a través del suelo o del agua y se puede acumular en las partes comestibles de las algas y plantas, generando una fuente potencial de arsénico en los suplementos dietéticos [Hedegaard, Rokkjær, & Sloth, 2013].

La habilidad que tienen las algas de acumular metales depende de muchos factores, entre los que se encuentran la biodisponibilidad de estos elementos en el agua y la capacidad que tienen de ser absorbidos por estos microorganismos [Besada, Andrade, Schultze, & González, 2009]. Por esta razón la evaluación de macrominerales y oligoelementos en espirulina es de gran interés a nivel nutricional y toxicológico. La mayoría de los oligoelementos presentes en la biomasa de algas son metales pesados [Campanella et al., 1998].

Tabla 1.5. Generalidades de la seguridad alimentaria con respecto a los metales pesados más importantes. Datos recogidos de la agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición (AECOSAN).

Metal	Formas en que se encuentra	Riesgo sanitario	Niveles ingesta tolerables (EFSA)
Cd	Excepcionalmente en estado puro Asociado a minerales de Zn, Cu o Pb.	Cancerígeno Disfunción renal por toxicidad. Desmineralización de los huesos. Acumulación en el hígado y riñón.	IST 2,5 µg/kg de peso corporal.
Hg	Mineral de cinabrio (sulfuro de mercurio). Impureza de otros minerales como la pirita (sulfuro de hierro).	Afecta al sistema nervioso central en desarrollo. Efectos adversos en la función locomotora y la función auditiva. Alteraciones en el riñón, hígado, sistema inmune y sistemas reproductores.	IST 1,3 µg/kg de peso corporal metilmercurio. IST 4 µg/kg de peso corporal mercurio inorgánico.
Pb	Excepcionalmente en estado elemental. Forma inorgánica más común que la orgánica.	Cancerígeno Efectos neurotóxicos Afecciones en el hígado, riñones y huesos Fallos renales y cardiovasculares.	No existe IST (ingesta semanal tolerable) *
As	Inorgánico [As (III) y As (V)]. Formas orgánicas.	Cancerígeno Efectos tóxicos. Lesiones en la piel.	No existe IST (ingesta semanal tolerable) *

* No existe IST (ingesta semanal tolerable).

No es lo mismo IST que los límites máximos permitidos por ley de concentración de cada metal en los distintos alimentos, ya que IST se refiere a la ingesta y la concentración a la composición del metal.

1.4. Legislación

Como ya se ha explicado anteriormente, la toxicidad hace obligatorio realizar estudios rutinarios en alimentos que pueden presentarlos ya que pueden generar un riesgo importante en el ser humano y en el medioambiente. Esto se debe a que no pueden degradarse ni química ni biológicamente y pueden mantenerse en el medio durante muchos años contaminando y acumulándose.

En cuanto a la legislación de Seguridad Alimentaria, en el Reglamento 1881/2006, de 19 de diciembre de 2006, de la Comisión, se fija por el Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social el contenido máximo de determinados contaminantes (donde se recogen datos de metales pesados como cadmio, plomo, mercurio o arsénico inorgánico y otros contaminantes medioambientales e industriales) en productos alimenticios. También se menciona la Recomendación (UE) 2018/464 de la Comisión, de 19 de marzo de 2018, relativa al control de metales y yodo en las algas marinas, las plantas halófilas y los productos a base de algas marinas; en ella se aconseja realizar exámenes de la existencia de As, Cd, Pb y Hg durante los años 2018, 2019 y 2020. En todos estos contenidos máximos establecidos por reglamento, hay que tener en cuenta todos los cambios de concentración de estos contaminantes que se generan por los procesos de secado, dilución o transformación. Es necesario mencionar que esta norma ha sido modificada en numerosas ocasiones debido a que en estudios realizados tanto en España como en otros países de la Unión Europea se demostró que a lo largo del procesado la concentración de metales pesados en algunos casos variaba. Gracias a estas investigaciones, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, creó y divulgó una lista con los distintos factores de transformación que ocasionaba este cambio de concentraciones.

Consultando la legislación nacional y de la Unión Europea referente a la seguridad alimentaria que es aprobada por la Comisión Institucional de AECOSAN (agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición), en el Reglamento Nº 420/2011 establece límites máximos permitidos de cadmio y plomo de 0.05 y 0,1 mg/kg de peso fresco propuestos los niveles con fines de evaluación del riesgo (OMS,2006); sin embargo en cuanto a los criterios que se refieren al contenido máximo de arsénico y mercurio en materia seca para algas son de 3 y 0,1 mg/kg, respectivamente.

A modo de ejemplo, en la ficha técnica de la espirulina de Guinama (laboratorio farmacéutico) se almacenan datos como la ausencia de yodo y pesticidas. Además se recogen datos físico-químicos de los metales pesados:

- Plomo (Pb): $\leq 1,0$ ppm.
- Cadmio (Cd): $\leq 0,1$ ppm.
- Mercurio (Hg): $\leq 0,1$ ppm.
- Arsénico (As): $\leq 1,0$ ppm.

Estas concentraciones de metales pesados no sobrepasan los límites máximos de concentración mencionados anteriormente.

2. OBJETIVOS.

A nivel reglamentario del Trabajo Fin de Grado de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén se informa de que “El trabajo fin de Título supone la realización por parte del alumnado de un proyecto, memoria o estudio en el que se integran y desarrollan contenidos formativos recibidos y debe estar orientado a la aplicación de competencias asociadas al título de Grado” [“Normativa de Trabajos Fin de Grado , Fin de Máster y otros Trabajos Fin de Título de la Universidad de Jaén,” 2017].

Por lo tanto, los objetivos principales en cuanto al reglamento hacen referencia a las competencias adquiridas y demostradas en esta memoria, que en la guía docente se recoge como resultados del aprendizaje:

- Capacidad para estructurar una defensa sólida de los puntos de vista personales apoyándose en conocimientos científicos bien fundados.
- Destreza en la elaboración de informes científicos complejos, bien estructurados y bien redactados.

Por otro lado, es imprescindible mencionar la importancia que tiene la formación del alumnado en la realización de este trabajo; esto se debe a la necesidad de demostrar los conocimientos adquiridos en un proyecto final que justifiquen la capacidad de análisis, síntesis y aprendizaje autónomo, la aptitud de organización y planificación, competencia para evaluar, interpretar y sintetizar datos e información Química, así como otros muchos resultados de aprendizaje.

Para la comprobación de todos estos conocimientos se ha propuesto como objetivo de esta investigación para la memoria de Trabajo de Fin de Grado una revisión bibliográfica de los diferentes métodos de análisis que se utilizan habitualmente para la determinación de ciertos componentes metálicos en la cianobacteria espirulina.

Los metales pesados, como cualquier otro elemento químico de la tabla periódica, no se pueden degradar más allá de su estado elemental; por lo tanto, no son creados ni destruidos por los organismos. Esto quiere decir que el metal se redistribuye naturalmente en el medio ambiente por los ciclos geológicos y biológicos.

Actualmente, uno de los problemas medioambientales más preocupantes es la presencia de metales pesados en el medio acuático. De hecho, existen numerosos métodos para su determinación. El problema es que si la cantidad de los mismos no supera el umbral de las 100 ppm, las técnicas empleadas llegan a ser insuficientes y excesivamente caras.

En la cianobacteria objeto de estudio de esta memoria se ha prestado especial atención a la concentración de plomo, cadmio, mercurio y arsénico, debido a que son los más propensos a adulterar los productos de espirulina [Al-dhabi, 2013]. Un nivel alto excediendo el límite recomendado de los metales mencionados en nuestra alga indicaría como principales causas a los contaminantes ambientales presentes en el lugar de crecimiento, además de la contaminación que se ha producido a través del agua y fertilizantes [“Spirulina in Human Nutrition and Health - Google Libros,” 2008].

3. METODOLOGÍA.

Para la elaboración de la revisión bibliográfica se han empleado bases de datos como Scopus, Google Académico o Microsoft Academic que han servido como fuente de información y han facilitado el acceso a artículos y recursos científicos. Además la biblioteca de la Universidad de Jaén ha permitido examinar distintos libros que ofrecen datos bastantes interesantes a la hora de comprender y redactar esta revisión. Los criterios de selección que se han utilizado para limitar la búsqueda han sido con las palabras clave “Spirulina platensis”, “Heavy metals” o “Analysis method”; a parte de otros términos usados. También se rige la búsqueda por directrices tales como el tipo de documento (artículos originales en su mayoría) o la limitación de tiempo donde ha sido importante la elección de artículos más recientes.

En el apartado 8 (ver Título “8. BIBLIOGRAFÍA.”) vienen recogidas todas las referencias de los artículos y libros que se han empleado para aportar datos. Para citar se ha utilizado un gestor de referencias bibliográficas denominado *Mendeley Desktop*, que ha servido como herramienta útil de gestión.

4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

Aunque la espirulina puede contener como tóxicos metales pesados y compuestos orgánicos, esta memoria se centra en el estudio de metales.

Concretamente la *Spirulina platensis* prolifera en aguas cálidas, dulces y alcalinas, además es un organismo mixotrófico. Es por esto que dependiendo de las condiciones ambientales y del entorno en el que crezca, aunque en un principio se encuentre exenta de toxicidad, puede poseer diferentes concentraciones de metales pesados. Éstos son un grupo de elementos químicos que se encuentran presentes en la naturaleza en pequeñas proporciones pero como motivo de ciertas actividades antrópicas su concentración se ha incrementado considerablemente en el ecosistema, además son los causantes de muchas enfermedades y alteraciones a los seres vivos. Por lo tanto, es necesario un estudio de la contaminación en el medio en el que vive la espirulina, debido a que ésta posee la capacidad de sobrevivir y reproducirse en hábitats contaminados con metales.

El problema surge cuando el alga se utiliza para la industria alimentaria, ya que dependiendo de los metales pesados que absorba durante su crecimiento puede considerarse tóxica o no. Los seres humanos están expuestos al peligro de contaminación debido a la ingesta directa de ciertos alimentos con altos porcentajes de metales, lo que ocasiona una amenaza ya que pueden bioacumularse en el cuerpo humano creando a corto y largo plazo distintas enfermedades [Beltrán & Gómez, 2015]. Entre los metales nocivos localizados con mayor frecuencia se encuentran el plomo, cadmio, mercurio y arsénico. En condiciones alcalinas y en presencia de iones fosfato y sulfato que provienen de fertilizantes, los iones cadmio y plomo que se encuentran en el medio generan compuestos que son solubles y precipitan o pueden flocular cuando se asocian a partículas diminutas. Estas partículas pequeñas se recogen junto con la biomasa de algas y, posteriormente, también se localizan en el material que queda después del procesamiento [“Spirulina in Human Nutrition and Health - Google Libros,” 2008]. Además los experimentos demuestran que la cianobacteria acumula metales traza de manera muy efectiva, lo cual es un beneficio a la hora de tener en cuenta los oligoelementos esenciales para los seres humanos, pero una desventaja si se habla de presencia de metales tóxicos [Al-dhabi, 2013].

Pese a que es indiscutible el hecho de que el consumo de espirulina está creciendo por todo el mundo, existen relativamente pocos estudios que informan sobre la proporción de metales que contienen o sus efectos sobre la salud de la población.

Es cierto que la espirulina se ha sometido a algunas investigaciones farmacológicas y pruebas de toxicidad que han dado resultados con bajas concentraciones tolerables recomendadas por agencias internacionales de regulación de alimentos; aun así es necesario un estudio en profundidad ya que hay poca información. Además, se hace necesario llevar a cabo de forma rutinaria controles de calidad para evaluar la posible presencia de metales.

Es tan alto el poder que la espirulina tiene para absorber metales que una de sus aplicaciones ha sido para eliminar metales en agua mediante bioacumulación o biosorción.

La biosorción se refiere a la captación de iones metálicos por medio de una biomasa (que puede ser viva o muerta) a través de mecanismos físicos y químicos. En este proceso se distinguen dos fases; la fase líquida que contiene las especies disueltas que van a ser sorbidas, y la fase sólida. Ambas fases interaccionan entre sí continuamente hasta establecerse un equilibrio gracias a la gran afinidad del biosorbente por el biosorbato, el cual es atraído hacia el sólido siendo atrapado por distintos mecanismos (*ver figura 1.3*).

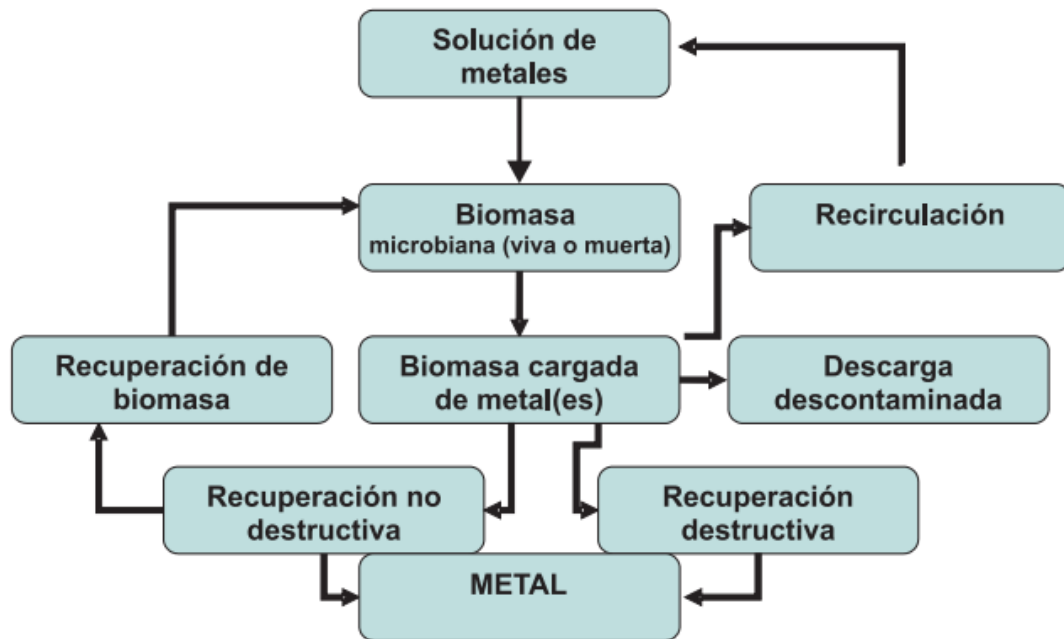


Figura 1.3. Esquema del proceso de biosorción de metales pesados de agua contaminada mediante microorganismos.

A modo de ejemplo de la alta capacidad de absorción de metales de la espirulina, se puede mencionar el trabajo realizado por Rangsayatorn [Rangsayatorn et al., 2004] en el cual se estudió la biosorción de cadmio por parte de la *Spirulina platensis* inmovilizada sobre gel de sílice y gel de alginato.

La conclusión obtenida tras emplear este tipo de método es que el cadmio muestra una gran capacidad de absorción en cianobacterias inmovilizadas. Así, la absorción del metal disminuye en la primera desorción. A pesar de ello, la capacidad que mostraba de desorción era aún mayor. Además, la temperatura no afecta y se podría emplear un rango más amplio de pH [Rangsayatorn et al., 2004].

Para la determinación de otros metales pesados como Co, Cu, Zn en *Spirulina platensis* se llevó a cabo debido a que la biomasa de esta alga se caracterizaba por su acumulación de metales en función del pH, isoterma de equilibrio, cinética y otros aspectos. Todo ello teniendo en cuenta la característica que tiene la cianobacteria de acumular metales por bioacumulación [Vannela & Verma, 2006].

5. REVISIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE METALES PESADOS EN ESPIRULINA.

En cuanto a los principales métodos de análisis de metales pesados, la determinación se puede llevar a cabo de distintas maneras, tanto en lo que respecta a la etapa de extracción y purificación de analito, como a la etapa de detección y cuantificación. Lógicamente, esto dependerá de distintos factores, tales como la muestra a analizar, los tipos de analitos y la concentración de los mismos (sensibilidad requerida).

Cualquier método de análisis conlleva las siguientes etapas: toma de muestra, pretratamiento (separación del analito de la muestra y eliminación de posibles interferentes), medida analítica y, por último, análisis de los resultados obtenidos.

Hay que tener en cuenta que para el análisis de metales pesados no es apto cualquier método y que se necesitan métodos de análisis muy sensibles y selectivos. Además, hay que tener en cuenta a la matriz. Según la legislación y el boletín del Instituto Nacional de Salud (INS), el método oficial para detectar metales pesados en materia vegetal es ICP-MS.

5.1. Toma de muestra y pretratamiento

Los estudios que determinan metales pesados en espirulina realizan la investigación a través de suplementos alimenticios comerciales en forma de cápsula o tableta, aunque también se han recogido datos de muestras de alga seleccionadas en un entorno concreto. La toma de muestra tiene como función que sea lo más representativa posible, y esto no siempre es fácil porque se requiere un elevado número de muestras, tanto naturales como comerciales en el caso de la espirulina.

En cuanto a la preparación de la muestra, los complementos alimenticios hechos a partir de espirulina se presentan en forma de tableta, que se trituran perfectamente con un mortero, o de manera capsular donde cada cápsula se hace polvo. Los metales contenidos en las muestras son determinados por una gran variedad de métodos analíticos, pero cuando se encuentran en pequeñas proporciones, la muestra de alga necesita un pretratamiento determinado. La preparación del material para la determinación del metal sirve para varios propósitos que varían según el tipo de muestra y el objetivo del análisis. Por lo tanto, el

pretratamiento tiene como finalidad disponer de la muestra en una forma adecuada para llevar a cabo el tratamiento de la muestra.

5.2. Tratamiento de muestra

El tratamiento de la muestra tiene un objetivo fundamental, adecuar la muestra para aplicar el método correspondiente.

Las funciones principales de la preparación de la muestra son las siguientes:

- Degradar y solubilizar la matriz para liberar los metales para su posterior determinación.
- Extraer los metales de esta matriz en un solvente más idóneo para el método analítico a utilizar en cada caso.
- Concentrar los metales presentes a muy baja proporción para que estén en una más indicada para el análisis.
- Separar un analito de un grupo de analitos de otras especies que puedan estar interfiriendo en el análisis, es decir, eliminar posibles interferencias y ruido para la detección.
- Diluir la matriz para que el efecto de la matriz sea constante y medible.
- Separar diferentes formas químicas del analito para el análisis individual de las especies presentes.

A modo general de todos los metales pesados indicados se hace referencia a los tratamientos empleados para explicar en qué consiste.

- Digestión.

Los procedimientos de digestión han de ser escogidos atendiendo al tipo de muestra, el metal a ser determinado y, finalmente, al método analítico. Los más interesantes y habituales son: digestión húmeda, digestión seca y extracción asistida por ultrasonidos.

La destrucción de la materia orgánica y liberación del tóxico se obtiene a través de la digestión. El proceso por vía húmeda se caracteriza porque la ceniza húmeda se descompone eliminando la matriz orgánica que rodea los metales para que queden en disolución, y hay de dos tipos: clásica, que se emplea para oxidantes energéticos, y por microondas.

Dentro de la digestión húmeda, la digestión ácida asistida por microondas es la más habitual. De hecho, en el caso del alga espirulina se realiza habitualmente este tipo de digestión una metodología que es útil; para muestras de pequeño tamaño. Esta técnica depende de manera estricta del tipo de muestra. La muestra de espirulina se digiere de forma sencilla empleando ácido nítrico a 200°C. La digestión de una muestra de espirulina se realiza calentando hasta que la materia orgánica se digiere por completo en un recipiente cerrado en un horno de microondas que posee varias ventajas acerca de los métodos de envase abierto. Los contenedores están hechos con polímeros resistentes a temperaturas altas, a menudo policarbonatos o PTFE (politetrafluoroetileno, teflón). Este material contiene menos contaminantes de origen metálico que los vasos de vidrio, de cerámica o que los crisoles. El envase sellado impide la contaminación por polvo en el aire u otros microorganismos, también reducen la evaporización a presión, por lo tanto, requiere menos solución ácida de digestión. Este envase sellado elimina a su vez las pérdidas de las especies metálicas volátiles, las cuales pueden ser un riesgo para la descomposición de la muestra en un contenedor abierto, especialmente en calcinación seca. Es necesario mencionar que esta técnica es peculiar por la limitación de tiempo que necesita para el enfriamiento antes de que el envase pueda ser abierto de nuevo y cada equipo puede durar un tiempo determinado para ello. En la digestión asistida por microondas se hace uso necesario de un horno microondas, un carrusel giratorio con vasos para la digestión de la muestra y un sistema de ventilación de los mismos de manera controlada.

- Calcinación.

La calcinación seca es útil para muchas muestras como alimentos o muestras botánicas, debido a la rápida y fácil destrucción de grandes cantidades de materia orgánica húmeda. Sin embargo, si el analito (en este caso metal) es volátil, o está en forma de organometálico (como es el ejemplo del metilmercurio) no podría utilizarse esta metodología. Es un método de preparación de muestras generalmente utilizado para la determinación del metal traza en los alimentos. El método consiste en depositar una cantidad determinada de muestra en un recipiente inerte abierto y por descomposición térmica gracias a un horno se elimina la materia orgánica de la muestra. Los residuos que quedan de la ceniza se disuelven en ácido. Las

principales ventajas de la ceniza seca es su simplicidad y la ausencia de materia orgánica en la ceniza.

Por otro lado, muchas de las matrices de muestras tanto orgánicas como inorgánicas pueden ser disueltas por calentamiento en una solución oxidante ácida.

-Extracción.

Otras muestras pueden ser tratadas por extracción asistida por ultrasonidos de los metales de la matriz. Este método es común emplearlo en muestras de aguas, donde un agente quelante puede ser usado para acomplejar el metal de interés, estableciendo su fácil separación de la matriz acuosa. El uso de la energía de ultrasonidos ha ido creciendo a lo largo de los años debido a que es una técnica eficiente, que disminuye el tiempo de trabajo y aumenta los rendimientos. Lo habitual es que esta extracción se aplique para compuestos orgánicos, aunque se ha utilizado para la determinación de metales pesados en muestras de alimentos también. Para el procedimiento se introduce la sonda ultrasónica en la solución y proporciona una potencia que es hasta veces mayor que la suministrada por el baño, de manera que reduce el tiempo de sonicación [Ruiz-medina & Llorent-martínez,2015].

-Otras.

También se pueden analizar elementos metálicos sin llevar a cabo la digestión, directamente sobre el sólido, aunque esta ausencia de tratamiento sólo es posible para ciertas técnicas de detección, tales como la fluorescencia de rayos X.

En la Tabla 5.1 se muestran algunos ejemplos de tratamiento y métodos de detección de metales pesados en espirulina. Puede observarse que el tratamiento de muestra habitual consiste en una digestión ácida asistida por microondas.

Tabla 5.1. Etapas del procedimiento experimental de los metales pesados más abundantes en espirulina.

Metal	Tratamiento	Técnica de detección	Niveles de muestras reales (mg/kg)	Referencia
Arsénico	Digestión ácida por microondas	AAS	0.002	Al-Homaidan, 2006
Arsénico	Digestión ácida por microondas	AAS	<1.0	Al-Homaidan, 2006 (USA-Belay, 1997)*
Arsénico	Digestión ácida por microondas	AAS	1.1	Al-Homaidan, 2006 (India, Torres Durán et al. 1998)*
Arsénico	Digestión ácida por microondas	AAS	2.9	Al-Homaidan, 2006 (México, Boudene et al., 1975)*
Cadmio	Digestión ácida por microondas	AAS	0.031	Al-Homaidan, 2006
Cadmio	Digestión ácida por microondas	AAS	<0.05	Al-Homaidan, 2006 (USA-Belay, 1997)*

Tabla 5.1. Continuación.

Metal	Tratamiento	Técnica de detección	Niveles de muestras reales (mg/Kg)	Referencia
Cadmio	Digestión ácida por microondas	AAS	1.0	Al-Homaidan, 2006 (India, Torres-Durán et al.1998)*
Cadmio	Digestión ácida por microondas	AAS	0.5	Al-Homaidan, 2006 (México, Boudene et al.,1975)*
Mercurio	Digestión ácida por microondas	AAS	0.008	Al-Homaidan, 2006
Mercurio	Digestión ácida por microondas	AAS	<0.05	Al-Homaidan, 2006 (USA-Belay,1997)*
Mercurio	Digestión ácida por microondas	AAS	0.1	Al-Homaidan, 2006 (India, Torres-Durán et al.1998)*
Mercurio	Digestión ácida por microondas	AAS	0.5	Al-Homaidan, 2006 (México, Boudene et al.,1975)*

Tabla 5.1 Continuación.

Metal	Tratamiento	Técnica de detección	Niveles de muestras reales (mg/Kg)	Referencia
Plomo	Digestión ácida por microondas	AAS	0.109	Al-Homaidan, 2006
Plomo	Digestión ácida por microondas	AAS	<1.0	Al-Homaidan, 2006 (USA-Belay,1997)*
Plomo	Digestión ácida por microondas	AAS	2.5	Al-Homaidan, 2006 (India, Torres-Durán et al.1998)*
Plomo	Digestión ácida por microondas	AAS	5.1	Al-Homaidan, 2006 (México, Boudene et al.,1975)*
Zinc	Digestión ácida por microondas	ICP-MS	0.533-6.225	Al-dhabi, 2013
Mercurio	Digestión ácida por microondas	ICP-MS	0.002-0.028	Al-dhabi, 2013
Manganeso	Digestión ácida por microondas	ICP-MS	0.005-2.248	Al-dhabi, 2013

Tabla 5.1 Continuación.

Metal	Tratamiento	Técnica de detección	Niveles de muestras reales (mg/Kg)	Referencia
Magnesio	Digestión ácida por microondas	ICP-MS	0.002-0.042	Al-dhabi, 2013
Platino	Digestión ácida por microondas	ICP-MS	0.001-0.012	Al-dhabi, 2013
Níquel	Digestión ácida por microondas	ICP-MS	0.211-4.672	Al-dhabi, 2013
Cadmio	Digestión ácida por microondas	ICP-MS	9.78	Ahmad et al., 2010
Arsénico	Digestión ácida por microondas	ICP-MS	1.56/9.45	Ahmad et al., 2010
Arsénico inorgánico	Digestión ácida por microondas	HPLC-ICP-MS	0.13	Hedegaard et al., 2013
Arsénico total	Digestión ácida por microondas	ICP-MS	2.6	Hedegaard et al., 2013

* Las referencias que aparecen entre paréntesis son descritas en el artículo [Al-Homaidan, 2006] como ejemplos de otros artículos.

5.3 Técnicas de detección

A continuación, se comentan brevemente diferentes técnicas de detección que pueden emplearse para la determinación de metales en la espirulina. Sin embargo, debido a que el ICP-MS es la técnica más ampliamente usada, se prestará especial atención a la misma.

Espectrometría de masa plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

ICP-MS es de las técnicas más importantes que hay que mencionar, ya que ha sido validada para la realización de gran cantidad de metales traza en plantas. Por ello se está utilizando en algas marinas y los productos de alimentación procedentes de ellas [Al-dhabi, 2013]. A modo aclarativo, es una técnica que se emplea para el análisis inorgánico elemental e isotópico, siendo capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica desde ng/L a mg/L.

Sus principales ventajas son su alta sensibilidad y la capacidad de llevar a cabo análisis multi-elemental, midiendo todos los elementos de la muestra de forma simultánea.

La muestra ha de ser introducida de forma líquida para generar un aerosol que pueda ser ionizado en el plasma.

El funcionamiento del equipo se explica mediante un sistema de introducción de la muestra donde existe un nebulizador que genera un aerosol de la muestra, éste entra a la cámara de spray para que sólo accedan las gotas del tamaño requerido a la zona del plasma. Gracias a las altas temperaturas, la muestra se atomiza, se excitan los átomos existentes y se ionizan. El plasma se crea pasando argón y va a una bobina de radiofrecuencias donde se suministra una corriente oscilante que genera un campo magnético y los iones de argón creados se capturan por ese campo, es entonces cuando se transforma el gas en plasma. Hay una región de interfase de dos conos metálicos en situación de vacío que se denomina cámara de expansión que se encarga de eliminar las moléculas de gas que existan dentro del espacio entre la interfase y el detector del equipo. Además existe una lente de iones que transporta el máximo número de iones analíticos y detiene todas las partículas, especies neutrales y fotones que puedan crear inestabilidad en la señal

aumentando el ruido de fondo. Por último, el espectrómetro de masas separa los iones para llevarlos al detector (ver *Figura 5.1*).



Figura 5.1. ICP-MS.

Voltamperometría.

Esta técnica es útil para el análisis y determinación de metales en variedades de algas distintas a la espirulina dónde se han estudiado las concentraciones de Cd y Pb. Si el mismo método se verificase para el alga espirulina podría emplearse la voltamperometría como técnica de detección.

Un sistema estándar voltamperométrico consta de una fuente de voltaje, un porta-electrodos con los electrodos y la celda electroquímica, y una unidad de registro de la corriente ³¹. Aunque los primeros métodos voltamétricos hacían uso de sólo dos electrodos, en la actualidad la voltamperometría moderna hace uso de tres electrodos sumergidos en una solución que contiene analito y un exceso de un electrolito de soporte (ver *Figura 5.2*).

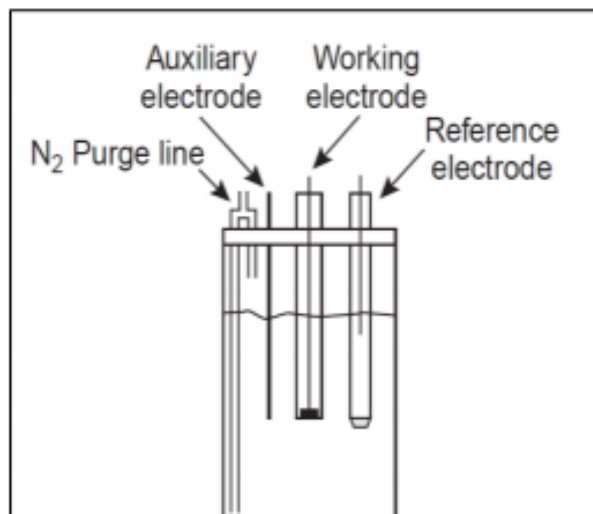


Figura 5.2. Celda electroquímica típica en voltamperometría [“Universidad católica de santa maría,” 2016].

El electrodo de trabajo, el cual es el más importante del sistema electroquímico, su potencial varía de manera lineal con el tiempo. Existen dos tipos el MME (electrodo multimodo) que incluye todos los tipos de electrodos de mercurio (DME o electrodo de gota de mercurio para ppm, SMDE para bajas ppm, HMDE o electrodo de gota suspendida de mercurio para trazas, es decir, ppb o ppt) y el RDE (electrodo de disco rotatorio) para aplicaciones especiales.

El electrodo de referencia (RE): que ofrece un potencial estable. Los potenciales en el WE se aplican con respecto al potencial de referencia constante. Hoy en día se utiliza principalmente sistemas de Ag/AgCl.

El tercer electrodo es el electrodo auxiliar (AE): La corriente fluye entre el trabajo y el electrodo auxiliar. Existen dos tipos disponibles: platino (Pt) y carbón vítreo.

Espectroscopía de absorción atómica de llama.

La técnica de absorción atómica de llama consiste en el siguiente mecanismo: la muestra en forma líquida es aspirada a través de un tubo capilar y conducida a un nebulizador donde ésta se desintegra y forma un rocío o pequeñas gotas de líquido. Las gotas formadas son conducidas a una llama, donde se produce una serie de eventos que originan la formación de átomos. Estos átomos absorben de manera la radiación emitida por la lámpara y la cantidad de radiación absorbida es función de

la concentración de los analitos. La señal de la lámpara una vez que pasa por la llama llega a un monocromador, que tiene como objetivo el discriminar todas las señales que acompañan la línea de interés. Esta señal de radiación electromagnética llega a un detector o transductor y pasa a un amplificador y por último a un sistema de lectura (ver *Figura 5.3*).

Los componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica son:

1. Una fuente de radiación que emita una línea específica para el elemento a analizar.
2. Un nebulizador, que por aspiración de la muestra líquida, forme pequeñas gotas para una atomización.
3. Un quemador que produzca la formación de átomos a partir de los componentes en solución.
4. Un sistema óptico que permita distinguir la radiación de longitud de onda de interés.
5. Un detector o transductor, que sea capaz de transformar, en relación proporcional, las señales de intensidad de radiación electromagnética, en señales eléctricas o de intensidad de corriente.
6. Un amplificador de la señal producida.
7. Un sistema de lectura o detector donde la señal de intensidad de corriente sea convertida a una señal que el operario pueda interpretar (ejemplo: transmitancia o absorbancia).

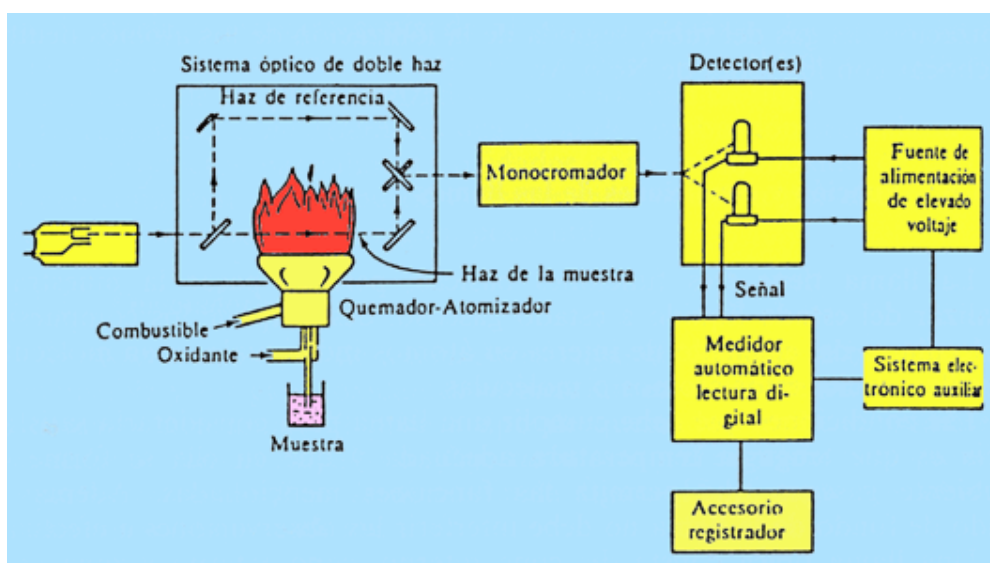


Figura 5.3. Esquema de la espectroscopía de absorción atómica.

Análisis de activación neutrónica instrumental (INAA).

Esta técnica de detección es muy empleada en geoquímica debido a que permite tener en cuenta gran cantidad de elementos al mismo tiempo mientras que tienen límites de detección especialmente bajos, pero es poco estudiada para algas. Sin embargo, en el artículo que determina macrominerales y elementos trazas en el alga espirulina se usa esta técnica. Está basada en la medición de radiaciones específicas producidas por reacciones nucleares, con un tiempo de irradiación de las muestras determinado. El flujo de neutrones da lugar a nuevos isótopos radiactivos de vida corta de los diferentes elementos que se analizan en la muestra. Estos nuevos isótopos que son radiactivos emiten radiaciones γ . Además, las intensidades de estas radiaciones son proporcionales a las concentraciones de los isótopos presentes. En este caso, al ser INAA se aplica sobre una muestra sólida, mientras que si se tratase de RNAA (análisis de activación neutrónica radioquímica) requeriría una preconcentración de los elementos seleccionados.

HPLC-ICP-MS de intercambio iónico.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación analítica que se produce gracias a la afinidad que tiene el analito por una de las dos fases de las que consta el método, la fase estacionaria o la fase móvil. Se utiliza para separar e identificar compuestos en base a su polaridad.

En el procedimiento general, un líquido (fase móvil) circula en contacto con la fase estacionaria, es decir, con un sólido u otro líquido inmiscible con el anterior. Por lo tanto, cuando la muestra con una gran cantidad de analitos se introduce en la corriente de la fase móvil, cada uno de los analitos avanza a una velocidad distinta. Esto es así debido a que cada elemento tiene una afinidad determinada por cada una de las fases del método ya mencionadas. Esto hace que las sustancias presentes en el sistema eluyan a un tiempo distinto y, por lo tanto, se separen unas de otras.

El sistema cromatográfico de alta resolución consta de una serie de dispositivos (*ver Figura 5.4*)

1. Reservorios.
2. Dispositivo que suministra eluyentes. Éste, a su vez, consta de una bomba y un dispositivo que mezcla los eluyentes.

3. Inyector que posibilita introducir la muestra en el sistema.
4. Columna HPLC que lleva el sistema de análisis.
5. Detector y registrador.
6. Desechos.

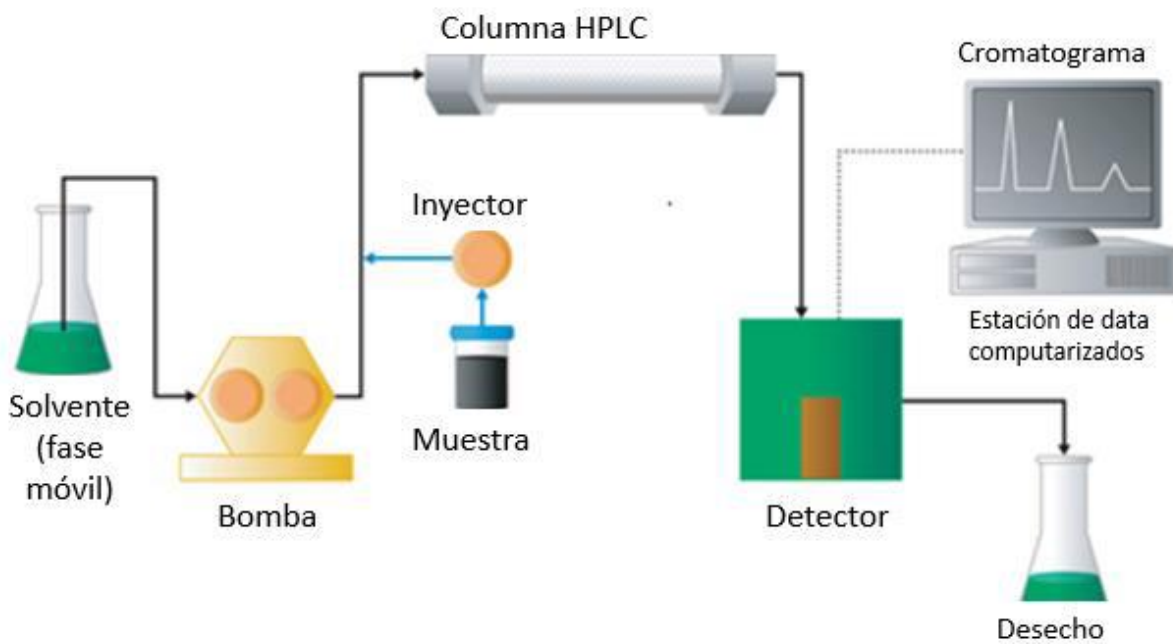


Figura 5.4. Esquema de un instrumento para HPLC.

[<http://bioquiwik1.wikispaces.com/La+hemoglobina+glicosilada?showComments=1>]

Para la determinación de arsénico inorgánico en suplementos alimentarios de espirulina se hace referencia a HPLC-ICP-MS. Esto se explica de la siguiente forma: el detector de este método puede ser un detector de fluorescencia, o puede estar acoplado en el cromatógrafo a un espectrómetro de masas (MS) que también pueda emplearse a modo de detector. HPLC-ICP-MS es el acoplamiento más sencillo en cuanto a instrumentación, tiene una interfase metálica y la salida de la columna va directamente al nebulizador.

5.4. Comparativa de los distintos métodos de análisis de metales pesados.

La absorción atómica es una técnica secuencial que realiza un análisis de un elemento, por lo tanto realiza un análisis cuantitativo, mientras que ICP es una

técnica simultánea que recoge el análisis de hasta 73 elementos de forma simultánea, realizando análisis tanto cualitativo como cuantitativo. ICP puede realizar determinaciones a bajas concentraciones mientras que para AAS es casi imposible detectar analitos a niveles de traza o ultratrazas. Por ejemplo, los límites de detección en absorción atómica para Cd pueden ser 0.8 µg/L, mientras que en ICP-MS 0.003 µg/L.

En AAS se necesita una lámpara para cada elemento que se va a determinar y requiere también de estándares, en ICP sólo se necesitan estándares de los elementos para el análisis cuantitativo. .

Para el ICP-MS entre sus ventajas se encuentran una alta precisión, un coste reducido económico y bajos límites de detección. Este tipo de análisis ha sido muy empleado gracias a su capacidad de discriminar isótopos. Además, el ICP-MS sobre otras técnicas para determinaciones elementales puede determinar isótopos individuales de cada elemento. Pero también tiene desventajas que limita su aplicación como por ejemplo problemas en la interfase por muestras con alto contenido de matriz o por la presencia de interferencias espectrales.

Por otro lado las ventajas principales para la espectroscopía de absorción es una determinación rápida y fiable para un elemento determinado, además de tener una alta sensibilidad en numerosos casos. Aunque también tiene sus limitaciones y es que para el método los metales se analizan individualmente y no de manera simultánea, además de que por regla general no es aplicable a no metales. Para la muestra tiene que ser orgánicas líquidas y sólidas que requieran de digestión previa al análisis. Para la determinación de metales pesados en algas comestibles comercializadas para consumo humano se detectaron por espectroscopía de absorción atómica metales como Cd, Pb, Hg, Cu, Zn, As total y As inorgánico, lo que sugiere que en futuros estudios de la espirulina se utilice esta técnica de forma regular para la detección de estos metales pesados [Besada et al., 2009].

Los elementos más ligeros que el Na deben ser analizados mediante AAS o ICP. Para elementos en bajas concentraciones se requieren técnicas analíticas con bajos límites de detección, como INAA o ICP-MS.

INAA permite la determinación de una gran cantidad de rastros elementos, incluidos los lantánidos y se aplica a diferentes campos de la ciencia. Es una técnica no destructiva, que no requiere ningún tratamiento de la muestra que sea complejo,

por lo que se minimiza la posible contaminación de la muestra. Se caracteriza por un alto grado de precisión y reproducibilidad [Campanella et al., 1998].

Sin embargo, algunos elementos como Cu, Mg, Mn o Pb no se detectan o apenas se reconocen por INAA, mientras que fácilmente son analizados por ICP.

En cuanto a las principales ventajas de HPLC-ICP-MS, es un proceso automatizado que requiere sólo de unos minutos para obtener los resultados. Además, los resultados son de una alta resolución y fácilmente legibles, obteniendo una alta resolución con resultados cuantitativos y cuantitativos. Las pruebas se reproducen fácilmente y tiene buena sensibilidad. Sin embargo, este equipo y mantenerlo es muy costoso. El funcionamiento también puede resultar complejo y debido a la velocidad del proceso, el equipo tiene una baja sensibilidad a algunos compuestos.

Por todas estas razones, la técnica HPLC no es un buen método de identificación, en general la cromatografía es útil como método de separación con grandes resultados, pero a la hora de identificación de compuestos no es de las técnicas más eficientes.

5.5. Aplicaciones analíticas

A continuación, se enumeran ejemplos específicos para la determinación de metales pesados en espirulina, detallando el método analítico empleado y comentando los resultados obtenidos (*ver Tabla 5.1*). Asimismo se comentan algunos métodos recogidos en dicha tabla.

Determinación de mercurio.

Al-dhabi analizó productos hechos a partir de espirulina comercializada para consumo humano [Al-dhabi, 2013]. En dicho estudio se digirieron numerosas muestras de productos comercializados distintos, donde el polvo de cada producto para el análisis de metales pesados se analizó por triplicado: 100 mg de muestra se sitúan en un recipiente de digestión tipo Teflón PFA y se disuelven en una disolución de ácido nítrico al 65%. Controlando la temperatura en el interior de los recipientes con la sonda, se emplearon condiciones de temperatura de 300°C y presión de 100

bares. Posteriormente se llevó a cabo la dilución de los digeridos, hasta un volumen final de 10-20 ml.

El contenido en metales (Ni, Zn, Hg, Pt, Mg y Mn) en espirulina se analizó mediante ICP-MS. Posteriormente, se llevaron a cabo estudios estadísticos con los resultados obtenidos. Mediante esta investigación se obtiene la proporción de Hg (a parte de otros muchos metales como el Pt, Mg, Mn, Ni y Zn) estando las concentraciones obtenidas entre 0.002-0.028 mg/kg [Al-dhabi, 2013].

Determinación de cadmio y arsénico.

Para la determinación de estos metales pesados se puede llevar a cabo un proceso de bioacumulación y diferentes procedimientos analíticos. En primer lugar, la muestra de alga se lava con agua mili-Q y es secada a una temperatura de 80°C durante 2 días. Una vez que la muestra esté seca, se tritura en un mortero hasta transformarla en un polvo muy fino. Las muestras de plantas fueron digeridas en una mezcla de 0.2 ml de peróxido de hidrógeno, 0.5 ml de ácido hidrofúrico y 1 ml de ácido nítrico para analizarla mediante ICP-MS modelo PerkinElmer Corporation (ICP Optima 3300 RL). Como materiales estándar de referencia se emplean Pb, Zn, Ni y Hg. Así, los límites de detección de Cu, As, Cd y Zn fueron 0.02, 0.0005, 0.001 y 0.05 mg/L, respectivamente [Ahmad et al., 2010].

Los niveles en muestras reales de arsénico se observan en la gráfica:

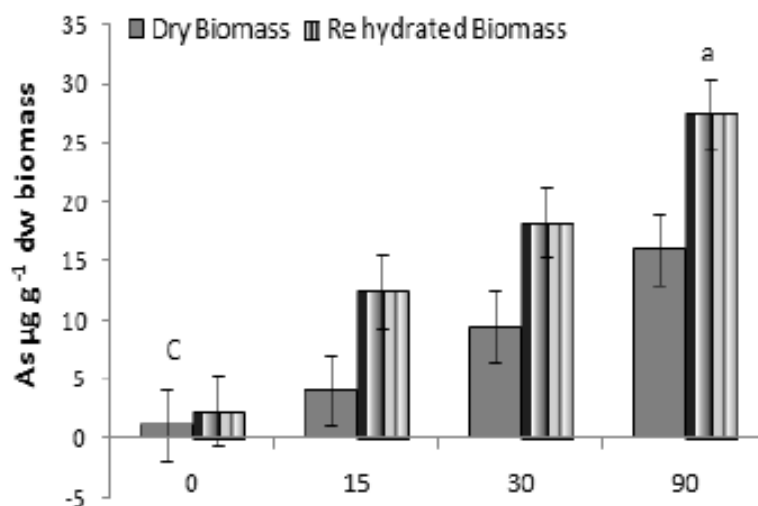


Figura 5.3. Acumulación de As en la muestra del alga espirulina desecada con el paso del tiempo [Ahmad et al., 2010].

El gráfico muestra la acumulación de As en espirulina, así como el peso fue 1.56/9.45 comparado con otras muestras del laboratorio [Ahmad et al., 2010]. El objetivo principal de este estudio fue la observación de la diferencia en los resultados cuando el alga está libre de metales. Mientras que en la gráfica 5.2 se muestra la acumulación del Cadmio en la muestra del alga espirulina desecada con el paso del tiempo.

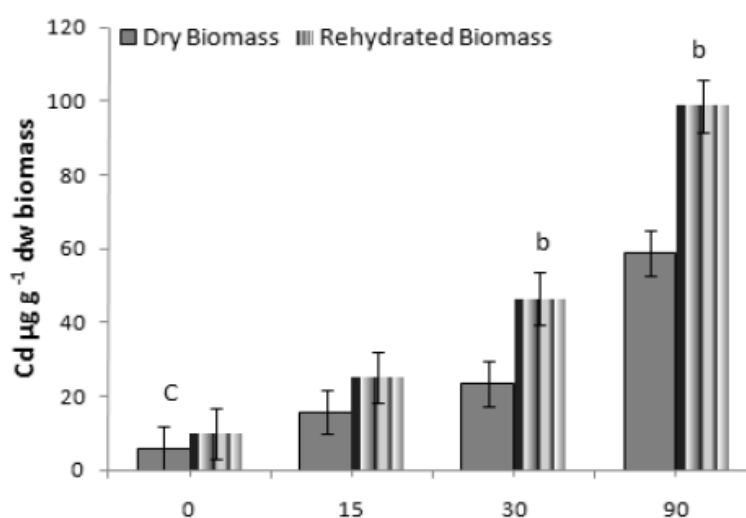


Figura 5.4. Acumulación de As en la muestra del alga espirulina desecada con el paso del tiempo [Ahmad et al., 2010].

Determinación de Fe, Mn, Cu, Zn, Se y As.

Por otro lado, la determinación de micronutrientes (mg/Kg) tales como hierro, manganeso, cobre, zinc, selenio y arsénico se llevó a cabo llevando a cabo mediante la extracción de una mezcla de nítrico-ácido hidroclicórico (75v/25v) a modo de tratamiento [Jocelyne et al., 2016]. Posteriormente, en este caso, de nuevo se utilizó la técnica de espectroscopía de absorción atómica.

Determinación de Cd, As, Hg y Pb.

También existe un método de determinación útil para la determinación de metales como Fe, As, Cd, Cu, Mn, Zn, Hg y Pb. Para esta determinación se toma una muestra de alga desecada a 90°C, tomándose 50 mg de esa muestra desecada

y se colocan dentro de diferentes tubos de digestión. Seguidamente se añaden 20 ml de ácido nítrico concentrado a cada tubo y se llevan a digestión a una temperatura de 120°C durante 2 horas. Una vez que las muestras estén enfriadas, se toman 20 ml de agua destilada que se adicionan a cada tubo y el contenido existente en cada uno de ellos se filtra empleando un filtro de 0.45 µm de porosidad. Posteriormente las soluciones fueron transferidas a un matraz de 25 ml y para llegar ha dicho volumen se enrasó con agua destilada. Finalmente para las medidas de los metales se emplearon 2 modelos Shimadzu de espectrometría de absorción atómica [Al-Homaidan, 2006].

Por otro lado, tras finalizar las medidas, las concentraciones obtenidas de As, Pb, Cd y Hg quedan recogidos en la Tabla 5.1. Así, las concentraciones medias encontradas para cada metal medidas en mg/Kg fueron: As 0.002, Cd 0.031, Hg 0.008 y Pb 0.109. Además, las concentraciones medias para otros metales como Cu, Fe, Mn y Zn fueron 8.51, 394.0, 27.88 y 21.81, las cuales quedan recogidas en la Tabla 5.1.

Determinación de elementos como Ag, Br, Ca, Co, Cu, Hg, Zn y otros muchos.

En este caso, las muestras de espirulina comercial se caracterizaron por su proporción de contenido macromineral y de elementos traza [Campanella et al., 1998]. Las determinaciones se llevaron a cabo por INAA e ICP, empleando materiales de referencia estándar. El uso de dos técnicas ha permitido la verificación de los resultados y la determinación de un espectro más amplio de elementos.

Determinación de arsénico total y arsénico inorgánico.

Para esta determinación de As se utilizaron 16 suplementos dietéticos diferentes hechos a base de hierbas y algas. Éstos provenían de distintos lugares como Asia, Europa y Estados Unidos. El contenido de arsénico total e inorgánico se determinó mediante ICP-MS y HPLC-ICP-MS de intercambio aniónico. Para la mayoría de las muestras As total N=14 y As inorgánico N=16.

Entre las muestras seleccionadas para la determinación se encuentra espirulina en forma capsular procedente de Dinamarca. Las muestras se introducen en cápsulas y se homogeneizan hasta obtener un polvo fino con ayuda de un molino eléctrico. Aproximadamente 0.5g del producto homogeneizado se digirió en

recipientes de cuarzo de alta presión utilizando microondas con 4 ml de HNO_3 concentrado. Después de la dilución a 100ml de volumen con agua ultrapura, se determinó el contenido total de arsénico mediante ICP-MS.

Para la determinación de arsénico inorgánico se utilizó HPLC-ICP-MS. Se llevó a cabo un procedimiento tal que se pesó alrededor de 0.2g de la muestra en un recipiente del sistema de microondas y se añadieron 10 ml de una solución de HCl y 3% H_2O_2 . Las muestras se introdujeron en el horno con temperatura 90°C y se mantuvo durante 20 minutos. El tratamiento de microondas actúa en la solubilización de la matriz y para la oxidación cuantitativa de As (III) a As (V), para poder calcular el arsénico inorgánico total por suma. Antes de llevar la muestra a analizar se filtró. En este caso, también se prepararon soluciones estándar de arseniato a cinco niveles de concentración para establecer una curva de calibración. Las soluciones para cromatografía de intercambio aniónico se prepararon disolviendo una cantidad apropiada de carbonato de amonio. En una solución acuosa de metanol al 3% (v/v), seguido del ajuste de pH a 10.3 con amoníaco acuoso al 25% (v/v) [Hedegaard et al., 2013].

6. CONCLUSIONES.

En este trabajo bibliográfico se han citado diferentes estudios de investigación, pero es importante destacar que la información disponible sobre el contenido de metales pesados en espirulina no es muy abundante, por lo que no es sencillo profundizar en el tema.

Fue interesante notar que los porcentajes de Hg estaban todos debajo del límite de detección en la mayoría de las muestras de espirulina que se analizaron. Los niveles más bajos y más altos de mercurio que se menciona en el artículo [Al-dhabi, 2013] no superaron los rangos esperados. Se analizaron veinticinco muestras donde fueron <0.03 mg/kg, lo que indica que el mercurio no es un contaminante peligroso en este caso. Para todos los productos analizados, el nivel de mercurio en todas las muestras de espirulina no supera la legislación de la Organización Mundial de la Salud.

En el artículo recogido donde se emplean dos técnicas para la misma determinación con el fin de mostrar la diferencia entre los resultados obtenidos por cada técnica se observa que los niveles tóxicos de metales pesados presentes en *Spirulina platensis* no contienen ningún tipo de riesgo por estar por debajo de los niveles permitidos.

En ninguna de las determinaciones revisadas se obtienen valores por encima de los límites permitidos por la legislación en algas, incluso cuando el alga ha sido utilizada para absorción de metales en aguas residuales, es decir, no se ha superado ninguno de los valores máximos de As, Hg, Cd o Pb. Hay que mencionar por lo tanto, que la problemática de que la espirulina comercializable contenga metales pesados perjudiciales para la salud no existe, o al menos no se ha detectado hasta la fecha.

La mayoría de los estudios realizados para metales pesados en espirulina son para comprobar la aplicación que ésta tiene en bioacumulación o fitorremediación.

Teniendo en cuenta todas las ventajas que caracterizan al ICP-MS, como su alta precisión y bajos límites de detección es la técnica más adecuada para el análisis de metales pesados en espirulina. La elección de la técnica analítica depende enteramente de la naturaleza del problema a resolver, en este caso

teniendo en cuenta la rapidez del ICP y todas las ventajas comentadas con respecto a otros métodos, éste es el más eficaz.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Al-Homaidan, A.A. (2006). Heavy metal levels in Saudi Arabian Spirulina. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9(14), 2693-2695.

<https://doi.org/10.3923/pjbs.2006.2693.2695>

Ahmad, A., Ghufuran, R., & Wahid, Z.A. (2010). Cd, As, Cu and Zn transfer through dry to rehydrated biomass of Spirulina Platensis from wastewater. Polish Journal of Environmental Studies, 19(5), 887-893.

Al-dhabi, N.A. (2013). Heavy metal analysis in comercial Spirulina products for human consumption. Saudi Journal of Biological Sciences, 4-9.

<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.006>

Al-Homaidan, A.A. (2006). Heavy metal levels in Saudi Arabian Spirulina. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9(14), 2693-2695.

<https://doi.org/10.3923/pjbs.2006.2693.2695>

Beltrán, M.E., & Gómez, A.M. (2015). Metales pesados (Cd, Cr y Hg): su impacto en el ambiente y posibles estrategias biotecnológicas para su remediación. I3+, 2(2), 82-112.

Besada, V., Andrade, J.M., Schultze, F., González, J.J. (2009). Heavy metals in edible seaweeds commercialised for human consumption. Journal of Marine Systems, 75 (1-2), 305-313.

<https://doi.org/10.1016/j.imarsys.2008.10.010>.

Campanella, L., Crescentini, G., Avino, P., Moauro, A. (1998). Determination of macrominerals and trace elements in the alga Spirulina platensis.

Analisis,26, 210-214.

<https://doi.org/DOI> 10.1051/analisis: 1998136.

Forbes, T., García, M.A., Armas, E., & Alimentaria, I. (2015). Empleo de ficocianina

como colorante. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, (September).6. Retrieved from [file:///C:/Users/SAMSUNG/Downloads/11-Tamara Forbes \(1\).pdf](file:///C:/Users/SAMSUNG/Downloads/11-Tamara%20Forbes%20(1).pdf)

Hedegaard, R.V., Rokkjaer, I., & Sloth, J.J. (2013). Total and inorganic arsenic in dietary supplements based on herbs, other botanicals and algae-a possible contributor to inorganic arsenic exposure. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(13), 4429-4435.

<https://doi.org/10.1007/s00216-013-6835-z>

Helbling, E., Gao, K., Ai, H., Ma, Z. & Villafane, V. (2006). Differential responses of *Nostoc sphaeroides* and *Arthrospira platensis* to solar ultraviolet radiation exposure. *Journal of Applied Phycology*. 18:57-66.

Herrero, M., Martín -Álvarez, P.J., Señoráns, F.J., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2005). Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chemistry*, 93(3), 417-423.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.037>

Jaime, L., Mendiola, J.A, Herrero, M., Soler-Rivas, C., Santoya, S., Señorans, F.J., Ibáñez, E. (2005). Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *Journal of Separation Science*, 28(16), 2111-2119.

<https://doi.org/10.1002/jssc.200500185>

Jocelyne, V., Moor, A., Pieme, C.A., Cabral, p., Biapa, N., & Elise, M. (2016). Chemical Composition of *Spirulina platensis* of Nomayos-yaounde (Cameroon),17.

Klejdus, B., Kopecky, J., Benesová, L., & Vacek, J. (2009). Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *Journal of Chromatography A*, 1216(5), 763-771.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.096>

Liotenberg, S., Campbell, R., Rippka, R., Houmard, J. & Tandeau de Marsac, N. (1996). Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. *Microbiology*.142: 611- 622.

Margaleff, R. 1977. *Ecología*. Editorial Omega. España. 392-400 pp.

Normativa de Trabajos Fin de Grado, Fin de Máster y otros Trabajos Fin de Título de la Universidad de Jaén (2017).

Ramírez-Moreno, L., & Olvera-Ramírez, R. (2006). Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia*, 31(9), 657-663. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/339/33912009.pdf>

Rangsayatorn, N., Pokethitiyook, P., Upatham, E, S., & Lanza, G.R. (2004). Cadmiun biosorption by cells of *Spirulina platensis* TISTR 8217 immobilized in alginate and silica gel. *Environment International*, 30(1), 57-63.
[https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00146-6).

Rodríguez, A.R., & Triana, F.C. (2006). Evaluación del pH en el cultivo de *Spirulina* spp. (=Arthrospira) bajo condiciones de laboratorio. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología Industrial, 106, Tesis Doctoral.

Sánchez, M., Bernal-castillo J., Rozo, C., & Rodríguez, I. (2003). *Spirulina* (*Arthrospira*): an edible microorganism. A review., 8, 1-19.

Sánchez, N., Bu, M., León, N., & Pérez-Saad, H. (2002). Fundamentos de una posible acción beneficiosa de la *Spirulina platensis* en las neuropatías periféricas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 7(3), 146-150.

Spirulina in Human Nutrition and Health- Google Libros. (2008). Ahmad, A., Ghufuran, R., & Wahid, Z.A. (2010). Cd, As, Cu and Zn transfer through dry to rehydrated biomass of *Spirulina Platensis* from wastewater. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(5), 887-893.