

005817

UNAM
POSGRADO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**ESTUDIOS *IN VIVO* E *IN VITRO* SOBRE EL EFECTO
HEPATOPROTECTOR DE LA *Spirulina maxima***

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A
M. en C. PATRICIA VICTORIA TORRES DURÁN

México, D.F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza quien me ha apoyado en este trabajo de investigación, en el laboratorio 10 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

A todo el personal académico del Posgrado en Ciencias Químicas, quienes han colaborado en mi formación. Y a todo el personal de este posgrado, que con amabilidad siempre me atendieron.

Agradezco a la DGAPA PAPITT-UNAM (IN218999), al CONACYT (27755-N) y DGEF (Subdirección de Apoyo al Posgrado, PAEP No. 1083332), las cuales han permitido desarrollar este trabajo de investigación

Dedico este trabajo y agradezco con particular cariño a mis papás y hermanos por haberme apoyado hasta el final con su amor y su paciencia incansables.

A todos mis amigos, agradezco su amistad y su apoyo.

ÍNDICE

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
INTRODUCCIÓN	1
I. GENERALIDADES	2
1. <i>Spirulina maxima</i>	2
1.1 Calidad de la biomasa de la <i>S. maxima</i>	3
1.2 Nutrición y actividad biológica	8
1.3 Toxicología	10
2. Hígado graso y Tetracloruro de carbono	10
2.1 Hígado graso	10
2.2 Tetracloruro de carbono CCl ₄	11
II. ANTECEDENTES	14
III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	15
IV. HIPÓTESIS	15
V. OBJETIVOS	16
VI. METODOLOGÍA	17
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	17
2. MATERIAL	21
3. METODOLOGÍA	22
3.1 ESTUDIO BIOLÓGICO	22
1ª Etapa	22
2ª Etapa	28
3ª Etapa	30
3.2 ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS	32
VII. RESULTADOS	34
VIII. DISCUSIÓN	54
IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	62
ANEXO I Publicación arbitrada de difusión internacional	67
ANEXO II Purificación de compuestos del extracto acetónico	73
REFERENCIAS	83

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

A	<i>Spirulina</i> DESENGRASADA
AGNE	ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS
AOAC	ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST
ATB (TBA)	ÁCIDO TIOBARBITÚRICO
AST	ASPARTATO AMINO TRANSFERASA
BHT	2,6-DI-TERT-BUTIL-4-METILFENOL
CCF	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA
CCl ₄	TETRACLORURO DE CARBONO
CG	CROMATOGRAFÍA DE GASES
CG-EM	CROMATÓGRAFO DE GASES ACOPLADO A EM
CT	COLESTEROL TOTAL
CHCl ₃	CLOROFORMO
DA	DIETA PURIFICADA CON <i>Spirulina</i> DESENGRASADA
DAC	DA Y TRATAMIENTO CON CCl ₄
DO	DIETA PURIFICADA CON <i>Spirulina</i> CON EXTRACTO ORGÁNICO
DOC	DO Y TRATAMIENTO CON CCl ₄
DN	DIETA PURIFICADA NORMAL
DNC	DN Y TRATAMIENTO CON CCl ₄
DS	DIETA PURIFICADA CON <i>Spirulina</i> ENTERA
DSC	DS Y TRATAMIENTO CON CCl ₄
EM	ESPECTROMETRÍA DE MASAS
EtOH	ETANOL
FL	FOSFOLÍPIDOS
L	CONCENTRADO LIOFILIZADO
LAD	LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD
LBD	LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD
LMBD	LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD
LT	LÍPIDOS TOTALES
DAM (MDA)	DIALDEHÍDO MALÓNICO
MeOH	METANOL
O	EXTRACTO ORGÁNICO (CHCl ₃ /MeOH)
RMN	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
S	<i>Spirulina</i> ENTERA
TAG	TRIACILGLICEROLES
SRATB (TBARS)	SUSTANCIAS REACTIVAS AL ATB
TEP	TETRAETOXIPROPANO

RESUMEN

Estudios previos en ratas Wistar macho demostraron que *Spirulina maxima* incluida 5% de la dieta tiene un efecto preventivo en el desarrollo de hígado graso inducido por una dieta rica en fructosa o por CCl₄ (1 mL/kg peso). Con el propósito de investigar en qué fracción de *Spirulina* se encuentra la actividad hepatoprotectora, se realizó una extracción con CHCl₃/MeOH (3:1, v/v), del cual se obtuvo la fracción desengrasada (A) 85.5% y la fracción oleosa (O) 14.5%. Estos extractos fueron adicionados a una dieta purificada DA y DO, respectivamente. Los resultados fueron comparados contra los obtenidos con una dieta normal DN. Las dietas respectivas se administraron durante todo el experimento a 6 grupos (n=6 por cada grupo). Al 5º día de administración con las dietas purificadas, las ratas se trataron con CCl₄ (1 mL/kg peso, DNC, DAC y DOC), o con el vehículo (1 mL/kg peso, DN, DA, y DO). Los resultados mostraron que después de 96 h del tratamiento, los lípidos totales y los triacilgliceroles hepáticos solamente se incrementaron en el grupo DNC, indicando que en ambos parámetros se observa el efecto hepatoprotector en los grupos alimentados con *Spirulina*. En el grupo DO, se observó una elevación significativa de los fosfolípidos hepáticos, lo que indica una posible incorporación de los lípidos de *Spirulina* (O) en la membrana de los hepatocitos. En cuanto a los lípidos séricos no se observaron diferencias significativas. El 68% del extracto (O) fueron ácidos grasos, los cuales se encontraron en la siguiente proporción: 16:1 (13.2%), 16:0 (66.2%), 18:3 (6.2%), 18:2 (11.1%), 18:0 (1.3%) y 20:4 (2.2%). El extracto (A) tuvo la siguiente composición: proteína 63.7%, cenizas 10.4%, fibra cruda 1.0%, y carbohidratos 24.9%. En otro experimento se determinaron las lipoproteínas séricas en animales alimentados con dieta purificada y *Spirulina* entera (DS), en las mismas condiciones experimentales a las referidas anteriormente. Se observó que en los grupos tratados con CCl₄ y alimentadas con *Spirulina* (DSC) la proporción de las lipoproteínas no se modificó; sin embargo, en el grupo DNC las LMBD se aumentaron y las LAD disminuyeron. También se determinaron productos de oxidación en los lípidos microsomaes: en esta fase se observó que el grupo DSC tuvo una menor oxidación con respecto a DNC, tanto en dienos conjugados como en productos finales de lipoperoxidación (TBARS). Por lo anterior, se propone que el efecto hepatoprotector de *Spirulina maxima* pudiera estar relacionado con su efecto antioxidante, lo que repercutiría en la proporción de las lipoproteínas. Además, se probó el efecto de *Spirulina* entera en ratas tratadas con una dosis subletal de CCl₄ (2 mL/kg peso). Al doble de la dosis inicial del hepatotóxico, *Spirulina* aún conservó el efecto hepatoprotector. El daño causado por el CCl₄ se evaluó con la elevación de las aminotransferasas séricas, lo cual mostró que en el grupo alimentado con *Spirulina* (DSC) dicho daño se atenuó significativamente. En cuanto a los lípidos hepáticos, los TAG, los AGNE y los LT en el grupo DSC no se elevaron por causa del hepatotóxico. Se comprobó que los ácidos grasos hepáticos en los grupos tratados con *Spirulina* tuvieron mayor proporción de ácidos grasos insaturados, a diferencia de los grupos DNC, lo que indica que *Spirulina* puede mejorar la calidad de los lípidos hepáticos. Por otra parte, se obtuvo un concentrado polar (L) de *Spirulina* entera extraída con H₂O/EtOH (9:1, v/v), el cual después de liofilizarlo mostró rendimiento de 20.5%. Con base en los efectos antioxidantes *in vivo* se evaluó la capacidad antioxidante *in vitro* de este extracto, tanto en hepatocitos de ratas sanas como en un sistema pro-oxidante. El efecto antioxidante se evaluó mediante la producción de TBARS. Se observó que en hepatocitos hubo efecto antioxidante de *Spirulina* a los 60 min cuando fueron incubados con glucosa o con etanol. Los resultados con *Spirulina* en el sistema pro-oxidante mostraron nuevamente el efecto antioxidante: control 188.0±21.0 y 66.9±0.5 µg/mL con extracto (L). Éste tiene la siguiente composición: proteína 36.5%, lípidos 4.9%, cenizas 25.6%, fibra cruda 0.9%, carbohidratos 32.1%. Una de las proteínas contenidas en el extracto mostró un peso molecular aproximado de 66 kDa. Además, se identificaron espectroscópicamente pigmentos como clorofila 'a' y carotenoides. Por todo lo anterior, se puede concluir que *Spirulina* posee un efecto hepatoprotector en la fracción A y O *in vivo*. Ejerce un efecto antioxidante y atenúa las modificaciones en las lipoproteínas ante el desafío con CCl₄ a una dosis de 1 mL/kg de peso. También conserva el efecto hepatoprotector ante una dosis subletal 2 mL/kg de peso, así como el efecto antioxidante. La fracción (L) es antioxidante en sistemas *in vitro*. Es posible que la capacidad hepatoprotectora de *Spirulina* sea debida a las propiedades antioxidantes de sus pigmentos, proteínas y minerales, así como a la calidad de sus ácidos grasos, los cuales podrían actuar sinérgicamente.

ABSTRACT

Previous studies from our laboratory have shown that *Spirulina maxima* (5% in diet) prevents the development of fatty liver induced by a fructose-rich diet or a single dose of CCl_4 (1 mL/Kg weight) in the rat. In this study it was investigated the hepatoprotective action of both the aqueous (A) or oil (O) fraction obtained from *Spirulina* extracted with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:1, v/v). After extraction, the percentages of A and O fractions were 85.5 and 14.5, respectively. The analysis of O fraction included 63% fatty acids distributed as: 16:1 (13.2%); 16:0 (66.2%); 18:3 (6.2%); 18:2 (11.1%); 18:0 (1.3%); 20:4 (2.2%). On the other hand, A fraction components were 63.7% protein, 10.4% ash, 1.0% raw fiber and 24.9% carbohydrates. A and O fractions were added to rats diet in DA and DO groups, respectively. The control group received normal diet (DN). Three groups of 12 rats received these diets during 5 days. At this time one half of each group received an injection of CCl_4 (1 mL/Kg body weight) being named DAC, DOC and DNC groups. The rest of the animals only received the same volume of the vehicle (groups DA, DO and DN). All the animals were sacrificed 96 h after treatment. Results indicated a hepatoprotective effect in groups DAC and DOC, however, group DNC presented an increase in total lipids and triacylglycerols in the liver. A second experiment was designed to study serum lipoproteins in animals treated with whole *Spirulina* (S) added to diet. The groups were DN and DS; the experimental conditions were as previously described and one half of the animal population received CCl_4 (DNC and DSC groups). The lipoprotein pattern showed an increase in very low-density lipoproteins (LMBD) and a decrease in low-density lipoproteins (LBD) in DNC group, however, it was not altered in DSC group. Lipid oxidation products were also studied in the liver microsomal fraction. DNS group showed a smaller oxidation fraction compared with DNC, comprising conjugated dienes and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The hepatoprotective effect of *Spirulina* could be related to its antioxidative action which is reflected on serum lipoproteins. The effect of whole *Spirulina* was also proved in rats that received a sublethal dose of CCl_4 (2 mL/Kg body weight). CCl_4 induced an increased level of serum aminotransferases in group DNC. However, the hepatoprotective action of *Spirulina* was observed 48 h posttreatment in group DSC; total lipids in the liver and triacylglycerols and non-saturated fatty acids in blood plasma were lower in DSC than in DNC group. Besides, blood lipids in DSC had a higher percentage of unsaturated fatty acids than DNC group. A polar fraction (L) was obtained from whole *Spirulina* extracted with $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (9:1, v/v) that was lyophilized, yielding 20.5 of the original volume. L fraction had the following composition: 33.4 protein, 4.5% lipids, 23.4 ash, 0.86% raw fiber, 23.1 carbohydrates, 6.3% nonproteinic nitrogen, 8.4% humidity. One of the main proteins in the extract had a relative mass of 66 kDa. There were also some pigments like chlorophyll (a) and carotenoids. L extract was proved *in vitro* using normal rat hepatocytes by the assay of TBARS after 60 min incubation. The results showed a lower TBARS production with than without L extract (6.9 ± 0.5 Vs $188.0 \pm 21.0 \mu\text{g/mL}$) added. In conclusion, both A and O extracts from *Spirulina* showed a hepatic protective effect *in vivo*, in animals that received CCl_4 . Whole *Spirulina* also protected from a CCl_4 sublethal dose. Finally, a polar extract from whole *Spirulina* also showed an antioxidative action *in vitro* in isolated hepatocytes.

INTRODUCCIÓN

En México existe una especial preocupación por ciertas enfermedades, las cuales tienen incidencia sobre la mortalidad general, como son las enfermedades cardio-cerebrovasculares, las hepáticas, la diabetes, el cáncer cervicouterino y las patologías relacionadas con la desnutrición infantil, entre otras. En 1999, la Secretaría de Salud informó que dentro de las primeras 20 causas de mortalidad en la República Mexicana se encuentran, en primer lugar, las enfermedades cardiovasculares (17.3%), en 3er. lugar la diabetes mellitus (10.27%), en 5° lugar las enfermedades hepáticas (6.76%), en 6° lugar las enfermedades cerebrovasculares (6.46%), y en 11° las enfermedades referentes a las deficiencias nutrimentales (2.44%) (135).

Estos datos han encauzado a este trabajo al estudio de las patologías hepáticas, en particular el hígado graso, el cual tiene como característica bioquímica el cumulo de triacilgliceroles (60). El hígado graso es más frecuente en personas que padecen o han padecido trastornos hepáticos, pero existen otras causas que lo desencadenan sin haber padecido una enfermedad hepática previa o simultánea (2). Entre éstas se encuentran la inanición (131), la alimentación con dietas ricas en grasas (2, 101), la diabetes mellitus (122), el consumo y absorción de hepatotóxicos, disolventes orgánicos como por ejemplo el etanol (22, 59, 66, 67, 77, 117, 119), el tetracloruro de carbono (15, 22, 38, 49, 72, 73, 83, 85, 90-95, 108, 127), así como por algunos fármacos (32, 37, 65).

Con el fin de contribuir al tratamiento de ésta patología se ha aprovechado como parte de la riqueza ecológica mexicana el estudio de una cianobacteria o alga azulverde, *Spirulina maxima*, y como modelo inductor específico de hígado graso se utilizó el CCl₄, por lo que a continuación se describen aspectos químicos y biológicos de mayor relevancia para este estudio.

I. GENERALIDADES

1. *Spirulina maxima*

Spirulina maxima es una cianobacteria cuya clasificación taxonómica es la siguiente: clase, *Cyanophyceae*; orden, *nostocales*; familia, *oscillatoriaceae*; género, *Spirulina*; especie, *maxima* o Geitleri (17, 20), la que se ha nombrado *Arthrospira maxima*, género cambiado por *Spirulina* (98, 100) Cada célula mide de 5 a 10 μm de diámetro, su forma es filamentosa y helicoidal, con 5 ó 6 torciones y se caracteriza por un diámetro de hélice de 50 a 60 μm , con un espesor de 80 μm y 200-300 μm de longitud, no ramificada (53).

Utilizada desde la época prehispánica, como se narra en la Historia de México por Bernal Díaz del Castillo: "Bernardino de Sahagún decía que durante las épocas más hostiles siempre vio en el lago Texcoco un lodo color azul-verde llamado Tecuittlatl que literalmente en náhuatl significa *excremento de piedras*, éste fue aprovechado por los indios para hacer pan semejante a tortas prensadas y secadas al sol, las cuales eran consumidas o comercializadas" (39)

El lugar típico de mayor producción seminatural de biomasa de *Spirulina maxima* fue, hasta 1994, el Lago de Texcoco, en México y el de *Spirulina platensis* en el lago de Chad, África. Las aguas de estos sitios presentan un pH entre 9-11, el cual es necesario para el desarrollo de estas cianobacterias, lo cual repercute en el rendimiento de su desarrollo y en el procesamiento (17).

1.1 Calidad de la biomasa de *Spirulina maxima*

Estudios químicos de la biomasa de *Spirulina maxima* han sido realizados por diversos autores (17, 20, 56): Clement estudió y comparó el valor nutritivo y la calidad proteica de *Spirulina maxima* y *platensis* mediante la determinación de sus aminoácidos y también se analizó la composición proximal de ambas especies en el cual encuentra similitud en dicha composición (18, 19) En la tabla I se muestra el análisis proximal de *S. maxima*.

TABLA I
COMPOSICIÓN PROXIMAL DE *Spirulina maxima*

	%*	%**
Proteína	55.0-64.0	57
Lípidos totales		14.87
Lípidos neutros	2.5-3.0	2.5
Hidratos de carbono	17-18	16.03
Digeribles		7.61
Fibra soluble		0.88
Fibra insoluble		7.39
Fibra cruda	0.2-0.7	1.29
Ác. nucléicos	4.5-5.0	
Cenizas	6.6-7.4	11.1
Humedad	4.2-7.0	----

Datos tomados de Ref. *17, 63 106 ** 116

En cuanto a la proteína ha sido considerada como una proteína de buena calidad ya que las concentraciones de aminoácidos de la proteína de *Spirulina* sobrepasan a los valores recomendados por la FAO, como se observa en la tabla II.

TABLA II

AMINOÁCIDOS INDISPENSABLES EN PROTEÍNA CRUDA DE *Spirulina maxima*

Aminoácidos	<i>Spirulina maxima</i> (g/100 g proteínas)	Patrón FAO 1957 (g/100 g proteínas)
Isoleucina	6.0	4.2
Leucina	5.8	4.8
Lisina	4.5	4.2
Metionina	2.1	2.2
Fenilalanina	4.9	2.8
Treonina	4.5	2.8
Triptofano	1.4	1.4
Valina	6.5	4.2

Datos tomados de Ref 17. 106

En la tabla III se muestra el contenido de vitaminas aportado por 100g de *Spirulina*, la cual es considerada una gran fuente del complejo B y de vitamina E (63).

TABLA III
CONTENIDO DE VITAMINAS EN *Spirulina maxima*

VITAMINA	mg/100 g <i>Spirulina</i>
Inositol	35.0
Ác nicotínico	11.8
Pantotenato-Ca	1.1
Biotina	0.04
Cianocobalamina	0.2
Piridoxina	0.3
Riboflavina	4.0
Tiamina	5.5
Tocoferol	19.0
Ác. fólico	0.048
Niacina	14.6

Datos tomados de Ref. 63. 126.

Se ha encontrado que *Spirulina* contiene 7% de cenizas, las cuales contienen un gran contenido de minerales como se muestra en la tabla IV.

TABLA IV
CONTENIDO DE MINERALES EN *Spirulina maxima*

MINERAL	mg/100 g <i>Spirulina</i>
Calcio	118.0
Fósforo	828.0
Fierro	53.0
Sodio	34.4
Cloro	420.0
Magnesio	116.3
Manganeso	2.2
Zinc	3.3
Potasio	1,435.0
Cromo	0.280*
Selenio	0.4ppm *

Datos tomados de Ref 17* 106

Del total de los lípidos contenidos en *Spirulina maxima* se ha reportado que el 75.7% son ácidos grasos, y, del total de éstos, los ácidos grasos insaturados se encuentran en un promedio de 62.16%, de los cuales destacan el linoleico y γ -linolénico, como se puede observar en la tabla V; estos ácidos grasos han mostrado tener efectos benéficos en el metabolismo de lípidos (44)

TABLA V

COMPOSICIÓN DE LÍPIDOS EN *Spirulina maxima*

LÍPIDOS TOTALES	% lípidos	% ácidos grasos
Esteroles	0.024*	
Alcoh. terpénicos	0.065*	
Pigmentos	1.2	
Otros lípidos	23.0	
Ácidos grasos	75.7	
Ácidos Grasos Saturados	37.8	
Láurico		0.4
Míristico		1.1
Palmitico		35.5
Heptadecanoico		0.22
Esteáico		0.66
Ácidos Grasos Insaturados	62.2	
Palmitoleico		3.32
Palmitoléico		4.07
Oleico		4.69
Linoleico		23.30
γ-Linolénico		19.53
α-Linolénico		7.26

Valores tomados de 56*, 106 reportan de 7% de lípidos totales de los cuales 5.3% son ácidos grasos es decir el 75.7% de los lípidos totales son ácidos grasos (46-63, 106-126).

En cuanto al contenido de esteroides, se han identificado en *Spirulina* los siguientes compuestos como se muestra en la tabla VI.

TABLA VI
ESTEROLES EN *Spirulina sp.*

4α23,24-trimetilcolesta-5,22-dien-ol
Colesterol
Brassicasterol
Ergosterol
Chalinasterol
Campesterol
Estigmasterol
24-etilcolesta-5,7,22-trien-ol

Datos tomados de Ref. 69-132

Recientemente se informó de la composición de los lípidos polares de *Spirulina* como se observa en la tabla VII, (91% de los lípidos totales extraídos con acetona); éstos se separaron por cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de gases acoplado a masas (CG-EM) y, finalmente, se caracterizaron por Resonancia Magnética Nuclear (118).

TABLA VII
CONTENIDO DE LÍPIDOS POLARES DE *Spirulina maxima*

Lípido	%
Monogalactosildiácilglicerol	5
Digalactosildiácilglicerol	22
Fosfatidilglicerol	31
Sulfoquinovosidiácilglicerol	32
Fosfatidil inositol	trazas

Datos tomados de Ref 118.

Se han encontrado otros lípidos polares en la pared celular de *Spirulina*; entre los cuales están los glicolípidos y sulfolípidos obtenidos de la fracción cruda de CHCl₃/MeOH (2:1, v/v), los que se separaron por CCF y se identificaron espectrometría de masas. Estos estudios revelaron que contienen ácido palmítico y otro ácido graso insaturado, como el ácido linoleico o el linolénico como se muestra en la tabla VIII

TABLA. VIII
GLICOLÍPIDOS Y SULFOLÍPIDOS DE *Spirulina maxima*

Lípido	%
O-β-D-galactosil-(1->1')-2',3'-di-O-acil-D-glicerol	23.7
O-β-D-galactosil-(1->1')-mono-O-acil-D-glicerol	11.3
O-α-D-galactosil-(1->6)-O-β-D-galactosil-(1->1')-2',3'-di-O-acil-D-glicerol	36.5
6-Sulfo-O-α-quinovosil-(1->1')-2',3'-di-O-acil-D-glicerol	28.5

Datos tomados de Ref 62

Otros compuestos polares encontrados en *Spirulina maxima* fueron los heteropolisacáridos, aislados por extracciones con agua, los cuales contienen L-ramnosa, ácido D-glucurónico, D-glucosa y D-manosa. Los carbohidratos insolubles remanentes, después de ser tratados con álcali caliente, contienen D-glucosamina y ácido murámico y también algunos aminoácidos (62). También se han encontrado compuestos coloridos como: Carotenoides, xantofilas y clorofilas los cuales proporcionan el color a *Spirulina* (7).

Estos estudios, que reportan el perfil químico de *Spirulina* y su gran contenido nutrimental, han sugerido la utilidad como suplemento alimenticio para consumo humano y animal, por lo que personas interesadas en la nutrición y balance energético han realizado estudios de nuevos productos con *Spirulina maxima*, para mejorar el estado nutrimental en México.

1.2 Nutrición y Actividad biológica

En un estudio exhaustivo, en el cual *Spirulina maxima* en polvo fue combinada con diversos alimentos, comúnmente utilizados para consumo humano, resultando productos más nutritivos, los alimentos que mostraron mejor aceptabilidad organoléptica fueron el jitomate y el chocolate. También tuvo aceptación cuando se mezcló con zanahorias, papas, y otros tubérculos (18).

La calidad nutrimental de *Spirulina maxima* ha mostrado los siguientes valores: Utilidad proteica neta 87, coeficiente proteico de 92 (107) y coeficiente de digestibilidad con valor de 83%, tomando como base a la caseína 100% (18)

En humanos, se han realizado estudios con sujetos voluntarios, quienes consumieron 2.8

g de *Spirulina* tres veces al día y después de 4 semanas de tratamiento, se observó una disminución significativa, con respecto a los controles, en su peso corporal basal (9)

Otro estudio en 30 voluntarios, en quienes después de haber consumido *Spirulina* se observó que el índice aterogénico disminuyó y los niveles de colesterol-LAD (colesterol de las lipoproteínas de alta densidad) aumentaron (78)

Con el fin de determinar el valor nutritivo de *Spirulina maxima* en mamíferos, *Spirulina* fue incorporada en la dieta durante dos ciclos reproductivos de ganado porcino, supliendo la proteína de la dieta por *Spirulina*. Durante el primer ciclo, el peso ganado fue ligeramente más alto en los animales alimentados con *Spirulina*, pero en el segundo ciclo el desarrollo fue significativamente alto (42)

En ratas, se observó significativamente la pérdida de tejido adiposo, aumentó la grasa fecal, disminuyó el colesterol en sangre y aumentó la vitamina A en hígado (76).

Otras especies de *Spirulinas* fueron estudiadas en cuanto su actividad biológica, por ejemplo, *Spirulina fusiformis* la cual se evaluó en humanos nativos de África con leucoplasia oral (lesión precancerosa en boca), *Spirulina* se les administró, 1g/día (vía oral) durante un año, después del tiempo transcurrido se observó que tenía un efecto inhibitorio de dicha displasia y disminuyendo el índice de mortalidad (71)

En otro estudio *in vitro* se trabajó con macrófagos de alvéolos, infectados con *E Coli*, a la vez se trataron con un extracto polar de *S. platensis*, se observó que en los cultivos tratados con el extracto tuvieron mayor resistencia a las infección con dicha bacteria (88) En esta

misma se observó, en modelos *in vivo*, que tuvo un efecto antihistamínico, ya que disminuyó el riesgo de una respuesta anafiláctica (129).

En este grupo de trabajo se observó que *Spirulina maxima* tiene un efecto relevante en los anillos de aorta de ratas, disminuyendo el tono vascular, lo que sugiere que una dieta con el alga puede ser importante para prevenir enfermedades vasculares (79-81).

Como ya se mencionó antes, este grupo de trabajo ha evaluado el efecto hepatoprotector de *Spirulina* en diferentes modelos de hígado graso en ratas (51, 114-116).

1.3 Toxicología

No se ha encontrado toxicidad atribuible al alga, como lo demuestran estudios toxicológicos subcrónicos (26, 105) y crónicos (24) incluyendo exámenes histopatológicos. Tampoco se observaron aspectos nocivos en las investigaciones relativas a la reproducción efectuadas en varias especies animales (23, 25, 28, 30, 31, 104) y en las correspondientes a genotoxicidad (27, 29, 102, 103).

2. HIGADO GRASO Y TETRACLORURO DE CARBONO (CCl₄)

2.1 Hígado graso

El hígado es un órgano que constituye del 2% al 5% del peso total del humano adulto, aproximadamente de 1.400 a 1.600 kg, el cual contiene de 10-12% de lípidos. De este órgano dependen innumerables funciones, como elaborar correctamente los metabolitos necesarios para las funciones vitales, se caracteriza por el desempeño de múltiples reacciones

enzimáticas especializadas durante los períodos del ciclo ayuno-dieta comprometido en procesar los hidratos de carbono, lípidos y proteínas, así como en la respuesta a sustancias tóxicas (2).

El hígado graso es definido bioquímicamente como el cúmulo de triacilgliceroles, en el cual se llega a multiplicar la concentración de lípidos hasta 125%, que como ya se ha mencionado se presenta en estados y/o enfermedades como son: la inanición prolongada (2, 131), ante una alimentación rica en grasas (2), en la diabetes mellitus (122), por el consumo y administración de hepatotóxicos como algunos fármacos (32, 36).

La administración de disolventes orgánicos produce hígado graso, entre los más comunes está el consumo de etanol, aunque es un tóxico metabolizable, provoca una estimulación de la síntesis de ácidos grasos, posteriormente a triacilgliceroles y después son depositados en el hígado, entre otros efectos (2, 35, 59, 66, 67, 77, 97, 119). También los disolventes derivados halogenados son causa de esteatosis o hígado graso, entre éstos se encuentra el tetracloruro de carbono del cual se hablará a continuación, ya que es el modelo de inducción de hígado graso en este trabajo

2.2 Tetracloruro de carbono (CCl₄)

A partir de la década de los sesentas y setentas, se reconoció que el CCl₄ es un hepatotóxico muy potente en cualquiera de sus formas de administración (por inhalación, por vía oral o por vía intraperitoneal) que conduce a acumular triacilgliceroles en el hígado. De los principales estudiosos se encuentra Recknagel, quien observó primeramente los cambios histopatológicos en muestras de hígado dañado con CCl₄ entonces él se cuestionó ¿cuál era el organelo blanco donde actúa el CCl₄? ¿de donde provenía la concentración tan alta de

triacilgliceroles en el hígado?, ¿qué estaría pasando con el transporte de lípidos?..Entonces con base en los resultados de sus estudios concluyó lo siguiente:

La velocidad de acumulación de triacilgliceroles podría ser porque está inhibida la β -oxidación o bien la síntesis de fosfolípidos se desvía a la formación de triacilgliceroles y estos se van a depositarse en hígado.

El organelo más lesionado son los microsomas, este daño es debido a una lipoperoxidación originado por los radicales triclorometilo, derivados del metabolismo del CCl_4 por el sistema citocromo P450 (84-85). Los radicales triclorometilo son muy reactivos que peroxidan los ácidos grasos insaturados en una reacción en cadena, ya que con una pequeña concentración de estos radicales daña severamente a los microsomas (128). Dado que la lipoperoxidación rompe la estructura y altera la función de las membranas (83, 90-93-95). Los microsomas al ser oxidados también disminuyen la síntesis de proteínas, por lo tanto, las lipoproteínas se ven afectadas desde su formación hasta el anclaje con los lípidos (52). Entonces, la siguiente aseveración fue que existe una falla en el transporte de triacilgliceroles del hígado al plasma y de los tejidos hacia el hígado, entonces, esto favorece el acúmulo de éstos en el hígado. Por lo tanto, además de los lípidos microsomales son las lipoproteínas las más dañadas por el CCl_4 (52, 83, 94).

Con base en lo anterior, actualmente se ha reportado que el CCl_4 interactúa con unión covalente con el DNA, demostrado en linfocitos de humanos *in vitro*, por lo que se considera que el CCl_4 también es mutagénico (68).

Otros autores observaron la relación que existe entre el cúmulo de triacilgliceroles y otras

manifestaciones bioquímicas del hígado graso y lo que sucede en la periferia, puesto que hasta el momento, la evolución del daño hepático se ha evaluado principalmente por la cuantificación de aminotransferasas séricas (1, 34).

II. ANTECEDENTES

Se demostró que la ficocianina (pigmento proteico de las Spirulinas) aislada de la *S. platensis*, tenía un efecto hepatoprotector ante el desafío del CCl₄ en ratas ambos administrados por vía intraperitoneal, demostrado con la medición de las aminotransferasas de los animales tratados con ficocianina, no se elevaban en la misma concentración como las de los animales que fueron tratados únicamente con CCl₄ (121).

En un estudio con ratas alimentadas con fructosa, con el fin de inducirles hiperlipidemia, se les administró una dieta suplementada con *S. platensis* y observaron que la lipoproteína lipasa y la lipasa hepática se veían incrementadas. Con base en los resultados se concluyó que la *S. platensis* tenía un efecto hipolipemiente (41).

Recientemente se ha demostrado la actividad hepatoprotectora de algunos productos naturales, tales como la *Schisandra chinensis* (87) y también se ha demostrado que *Spirulina maxima* a la concentración de 5% de una dieta purificada (13), tiene efecto hipolipemiente y protector sobre el desarrollo del hígado graso inducido por una dieta rica en fructosa (51) y sobre el hígado graso inducido con tetracloruro de carbono (114, 115)

III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Aunque se ha demostrado el efecto hepatoprotector de *Spirulina maxima* sobre el hígado graso, aún se desconocen tanto los principios activos del alga como otras propiedades farmacológicas que actúan conjuntamente. El poder dilucidar, a nivel molecular, las rutas posibles por medio de las cuales *Spirulina* tiene efecto e identificar algunos de sus compuestos, permitirá diseñar estrategias terapéuticas para proteger al hígado de los diferentes hepatotóxicos.

IV. HIPÓTESIS

Spirulina maxima posee uno o varios componentes hepatoprotectores, que podrían actuar sinérgicamente.

III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Aunque se ha demostrado el efecto hepatoprotector de *Spirulina maxima* sobre el hígado graso, aún se desconocen tanto los principios activos del alga como otras propiedades farmacológicas que actúan conjuntamente. El poder dilucidar, a nivel molecular, las rutas posibles por medio de las cuales *Spirulina* tiene efecto e identificar algunos de sus compuestos, permitirá diseñar estrategias terapéuticas para proteger al hígado de los diferentes hepatotóxicos.

IV. HIPÓTESIS

Spirulina maxima posee uno o varios componentes hepatoprotectores, que podrían actuar sinérgicamente.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar algunas fracciones de *Spirulina maxima* con actividad biológica sobre el hígado graso.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Obtener fracciones de diferente polaridad de *Spirulina maxima*.
- 2) Evaluar *in vivo* el efecto hepatoprotector de dos diferentes fracciones de *Spirulina maxima* sobre el desarrollo del hígado graso.
- 3) Determinar otros efectos biológicos por medio de las cuales puede estar actuando *Spirulina maxima* en el modelo de hígado graso.
- 4) Determinar el efecto hepatoprotector de *Spirulina* ante el desafío una dosis subletal de CCl_4
- 5) Establecer un sistema *in vitro* para la evaluar la actividad antioxidante en otras fracciones
- 6) Identificación de algunos extractos de *Spirulina maxima* con actividad antioxidante y/o hepatoprotectora

VI. METODOLOGÍA

1. DISEÑO EXPERIMENTAL (DIAGRAMA 1)

-Se llevó a cabo una separación de algunas fracciones de *Spirulina maxima* por medio del fraccionamiento con diferentes sistemas de disolventes y diferentes grados de polaridad (Diagramas 2 y 4)

-Se evaluó el efecto *in vivo* de *Spirulina* sobre el desarrollo del hígado graso inducido con CCl_4 (1 y 2 mL/kg peso, dosis única), utilizando ratas Wistar macho, 200 g promedio, alimentadas con dietas purificadas adicionadas con *Spirulina* y con dos diferentes extractos de ésta.

-Con una de las fracciones más polares se determinó el efecto antioxidante *in vitro* en hepatocitos y también en un sistema pro-oxidante.

-Las fracciones que han tenido efecto biológico, entre otras, se separaron por medio de cromatografía en columna y se analizaron por cromatografía de gases (CG), por espectroscopía por luz visible, ultravioleta (UV), así como por espectrometría de masas (EM).

-Se realizaron pruebas de homogeneidad de Hartley, análisis de varianza y pruebas de rango múltiple, por medio del paquete estadístico para las Ciencias Sociales o sistema SPSS (Statistical Package for Social Sciences)

**DIAGRAMA1
DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL**

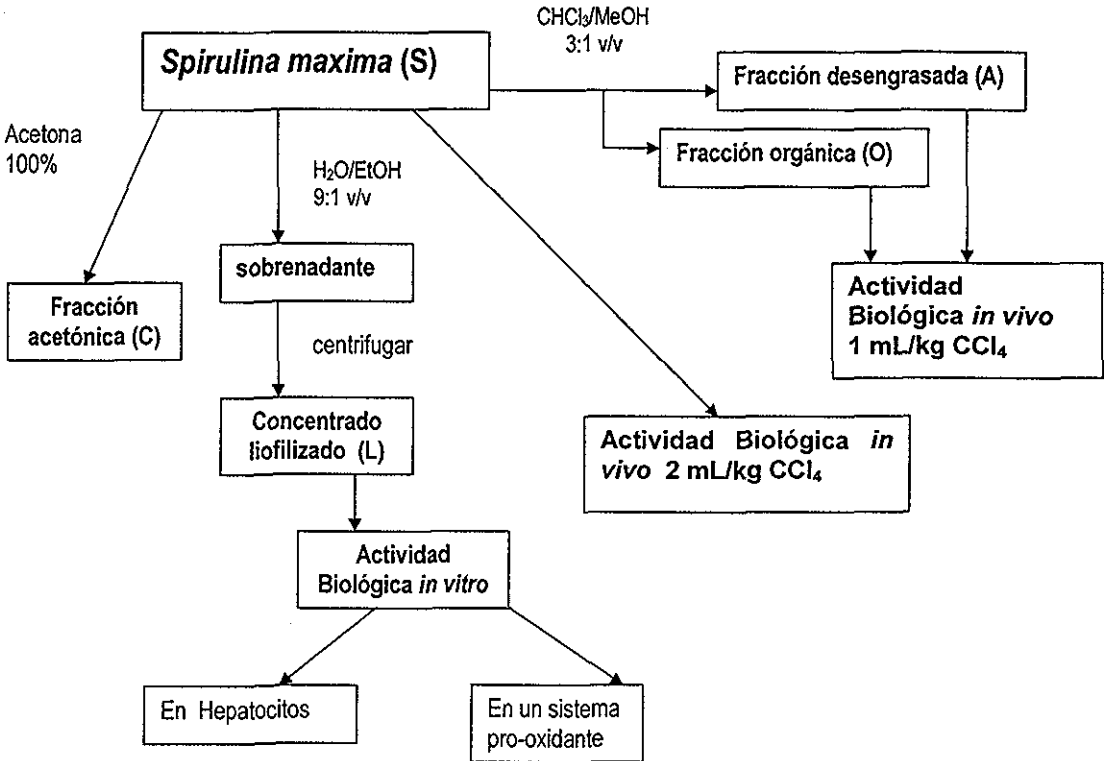


Diagrama 1. Se trabajó con cuatro tipo de muestras para probar su actividad biológica: S (*Spirulina* entera), O (fracción orgánica. CHCl₃/MeOH), A (fracción desengrasada), L (fracción polar liofilizada) A estas fracciones además se les realizó un análisis para identificar algunos de sus componentes químicos. El extracto C (extracto acetónico) se fraccionó con diversos sistemas de disolventes, hasta purificar alguno de los extractos los resultados se presentan en el anexo II ya que estos extractos no fueron probados biológicamente

DIAGRAMA 2

OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE *Spirulina maxima* CON CHCl₃/MeOH Y SU CORRESPONDIENTE FRACCIÓN DESENGRASADA

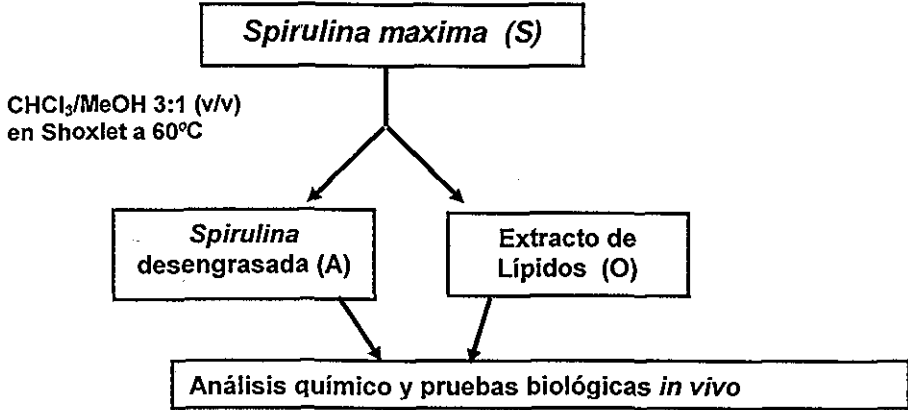


Diagrama 2. Las fracciones A y O se les probó el efecto hepatoprotector, administradas incorporadas dentro de una dieta purificada, como se muestra en la tabla IX, en un modelo *in vivo*. A la fracción A se le realizó análisis proximal y un gel electroforético, a la fracción O se separó por cromatografía en columna y se identificaron algunos de sus lípidos por un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) y *Spirulina* entera (S) se utilizó para realizar otras pruebas de actividad biológica (lipoproteínas y lipoperoxidación)

**TABLA IX
DIETAS PURIFICADAS**

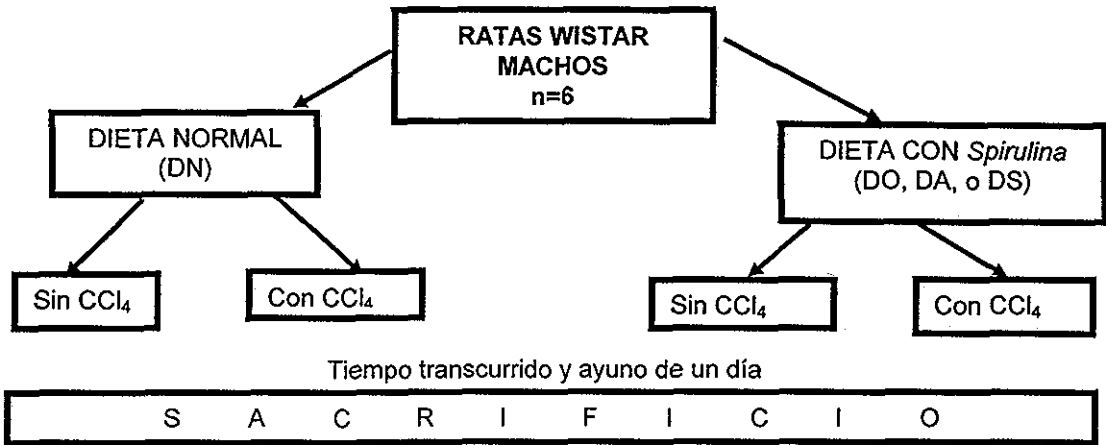
Producto	Dieta normal sin <i>Spirulina</i> (DN)	Dieta con <i>Spirulina</i> entera (DS)	Dieta* con <i>Spirulina</i> (DA) desengrasada	Dieta* con lípidos de <i>Spirulina</i> (DO)
Caseína	20.0	17.0	15.0	20.0
Harina maíz	7.0	5.0	7.0	7.0
Aceite	5.0	5.0	5.0	4.3
Celulosa	3.0	3.0	3.0	3.0
Vitaminas	1.0	1.0	1.0	1.0
Minerales	3.5	3.5	3.5	3.5
Metionina	0.3	0.3	0.3	0.3
Cl-Colina	0.2	0.2	0.2	0.2
Glucosa	60.0	60.0	60.0	60.0
<i>Spirulina</i> S	-	5.0	-	-
<i>Spirulina</i> A	-	-	5.0	-
<i>Spirulina</i> O	-	-	-	0.7

Valores dados en %, son valores ajustados para las formulaciones DS, DA y DO (13)

*) *Spirulina* desengrasada con el disolvente de Folch (CHCl₃/MeOH 3:1, v/v).

Spirulinas N A y O: *Spirulina* entera fracción desengrasada y fracción oleosa respectivamente.

DIAGRAMA 3
DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS ESTUDIOS
IN VIVO CON LAS MUESTRAS S), O) y A)



Las ratas recibieron desde 5 días previos y post-tratamiento con CCl₄ hasta un día antes del sacrificio, 96 h para 1 mL/kg . 24 y 48 para 2 mL/kg de CCl₄ post-tratamiento

DIAGRAMA 4
DISEÑO EXPERIMENTAL CON LA FRACCIÓN DE *Spirulina maxima*
OBTENIDA CON H₂O/EtOH Y SUS PRUEBAS IN VITRO

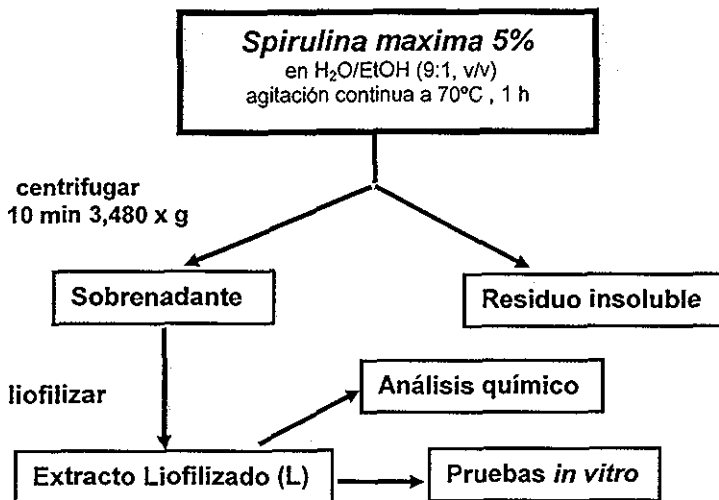


Diagrama 4. El extracto L se le probó la capacidad antioxidante *in vitro* tanto en un sistema pro-oxidante (H₂O₂/FeCl₃) como en hepatocitos ante el desafío de la intoxicación con etanol.

2. MATERIAL

2.1 Reactivos

- 2,4-tert-butil-4-metilfenol o butilato hidroxil tolueno (BHT), Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo.).
- Ácido tiobarbitúrico (ATB), Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo.).
- Ácido 1-amino-2-naftol-sulfónico (AAMNS), Mallinckrodt (México, D. F.)
- Bisulfato de sodio (NaH_2PO_4), Mallinckrodt, (México, D. F.)
- Colagenasa IV, Sigma Chemical, Co (St. Louis, Mo.)
- Disolventes grado analítico, Merck (México, D. F.)
- El paquete enzimático para la determinación de la aspartato amino transferasas (AST) fueron adquiridas de Merck (México, D. F.)
- Harina nixtamalizada "Minsa" y aceite de maíz "Mazola" (México, D. F.)
- Los demás reactivos de grado analítico fueron de Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo.).
- Los sistemas enzimáticos para la determinación de triacilgliceroles (TAG), colesterol total (CT), ácidos grasos no esterificados (AGNE) fueron adquiridos de Boehringer-Mannheim (México, D.F.)
- Molibdato de amonio, Sigma Chemical, Co (St. Louis, Mo.)
- Nutrientes (vitaminas y minerales) de Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo.)
- *Spirulina maxima* deshidratada "Spirulina Mexicana, S.A. de C.V." (México, D.F.)
- Tetracloruro de carbono (CCl_4) Sigma- Chemical, Co. (St. Louis, Mo.).
- Tetraetoxipropano (TEP), Sigma Chemical, Co (St. Louis, Mo.).

2.2-Equipo

- Analizador de proteínas T-790, BECKMAN.
- Centrifuga Centra-MP4R, IEC.
- Espectrofotómetro DU-640, BECKMAN,

- Espectrofotómetro PM2DL, Zeiss.
- Homogeneizador PT 10-35, POLYTRON.
- Liofilizadora Maxi-dry-lyo, HETO.
- Liofilizadora, LABCONCO.
- Ultracentrífuga con refrigerante RC-5B, SORVALL.

3. METODOLOGÍA

3.1 ESTUDIO BIOLÓGICO

1ª Etapa

EVALUACIÓN *IN VIVO* DE DIFERENTES FRACCIONES DE *Spirulina maxima*

Con el objeto de conocer si las fracciones obtenidas de *Spirulina*, la fracción desengrasada (extracto A) y la fracción oleosa (extracto O) como se observa en el Diagrama 2, conservan el efecto biológico sobre el desarrollo del hígado graso inducido con CCl₄ (1 mL/kg de peso) *in vivo*, se cuantificaron las concentraciones de colesterol total (CT) y triacilgliceroles (TAG) en lípidos totales (LT) de hígado y en suero, medidos en las ratas de los diferentes grupos (Tabla X).

TABLA X
ETIQUETAS CORRESPONDIENTES A
LOS TIPOS DE DIETA Y TRATAMIENTO

Tiempo de postratamiento	Dieta y tratamiento
0 h	DN
	DO
	DA
96 h	DNC
	DOC
	DAC

DN = Dieta normal. DO = Dieta con extracto oleoso de *Spirulina*, DA = Dieta con *Spirulina* desengrasada
 DNC = Dieta normal y CCl₄, DOC = Dieta con extracto oleoso de *Spirulina* y tratadas con CCl₄
 DAC = Dieta con *Spirulina* desengrasada y tratadas con CCl₄

El mejor tiempo experimental para observar el efecto de *Spirulina* se determinó en estudios previos (114), el cual fue a las 96 h. La *Spirulina* se incluyó en las dietas como producto desengrasado con el disolvente de Folch ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3:1, v/v), y, como extracto oleoso, añadidos en la formulación como el contenido equivalente al 5% de *Spirulina* entera, sin alterar la composición de proteína y grasa (Tabla IX).

a) Aclimatación. Con el propósito de que las ratas macho, de la cepa Wistar de 200-220 g, se adecuaran a la dieta y al *habitat*, se alimentaron durante 5 días con las dietas purificadas, en raciones de 20 g/rata/día. El agua se les suministró *ad libitum*. Se les mantuvo en períodos de 12 h luz-oscuridad y en jaulas con tres ratas, cada una colocada en forma aleatoria. En el último día de aclimatación, se realizó el tratamiento de inducción de hígado graso y este momento se consideró como el tiempo cero como se describe a continuación (116).

b) Inducción de hígado graso. A los grupos de animales ($n=6$), que desarrollaron hígado graso se les inyectó con jeringa para insulina, por vía intraperitoneal, una sola dosis de CCl_4 utilizando aceite de maíz -como vehículo- (1:1, v/v). La dosis administrada fue de 1 mL de CCl_4/kg de peso corporal (cuando las ratas recibieron las dietas DN, DS, DO y DA, hasta 96 h post-tratamiento); así mismo se utilizó una dosis subletal de 2 mL/kg de peso (cuando las ratas recibieron las dietas DN y DS hasta 24 y 48 postratamiento). Los animales de los grupos control solamente recibieron el vehículo, a la misma dosis de experimentación (1, 116).

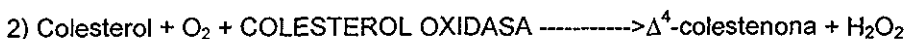
c) Obtención del material biológico. Después de haber transcurrido el tiempo necesario para cada prueba, las ratas se sometieron a ayuno de 12 h mínimo, previo al sacrificio. Los animales se pesaron e inmediatamente se sacrificaron por decapitación; simultáneamente se

recolectó la sangre en tubos. Una vez obtenida, ésta se centrifugó a 3,150 x g durante 15 min para obtener el respectivo suero. El hígado se disecó, se determinó el peso total y se obtuvieron fragmentos del mismo lóbulo con un peso alrededor de 1 g para la extracción de lípidos totales hepáticos, según el método de Folch (45).

d) Extracción de lípidos de hígado con el disolvente de Folch y colaboradores. El fragmento de hígado se homogeneizó en 4 volúmenes de amortiguador de fosfatos (Na_2HPO_4 , 0.05 M), a pH 7.2, en un homogenizador a máxima velocidad durante 3 min. Posteriormente, se ajustó el pH hasta 6 con un potenciómetro. El producto homogéneo se colocó en un embudo de separación con 20 mL de mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:1, v/v). Para cada muestra se hicieron 3 extracciones con la mezcla. Las fases se separaron utilizando un embudo de y la fase orgánica donde se encontraban los lípidos se colectó en viales con tapa de teflón. Sin evaporar la tercera extracción se colectaron 20 mL para ser lavado con 10 mL de agua destilada, la fase clorofórmica se trató con sulfato de sodio anhidro para eliminar las trazas de humedad. El extracto se llevó a sequedad a 40°C, bajo corriente de N_2 . La cantidad de lípidos totales se determinó gravimétricamente. Los extractos de lípidos se almacenaron a -70°C hasta el momento de su análisis (45)

e) Análisis de lípidos. A los lípidos obtenidos se les realizaron las siguientes pruebas:

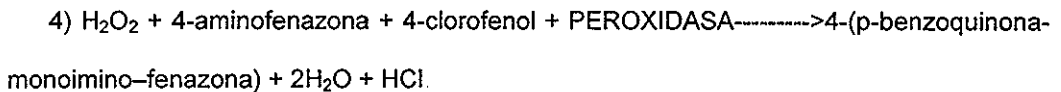
e.1) Determinación colorimétrica de colesterol total, por medio de un paquete enzimático obtenido de Boehringer-Mannheim (México, D F.) basado en las siguientes reacciones:



fenazona + 4H₂O.

El colesterol total se determinó mediante el uso de un compuesto colorido 4-(p-benzoquinona-monoimino-fenazona) que absorbe a 546 nm.

e.2) Determinación colorimétrica de triacilgliceroles (TAG) por medio de un paquete enzimático obtenido de Boehringer-Mannheim (México, D.F.). Las siguientes reacciones muestran el principio:



Los TAG se determinaron por medio de un compuesto colorido que absorbe a 546 nm: 4-(p-benzoquinona-monoimino-fenazona).

e.3 Determinación de fosfolípidos. Para ello se empleó la técnica de Fiske-Subarrow. Se disolvieron los lípidos extraídos por el método de Folch y colaboradores en 500 µL de mezcla de disolventes de extracción y se tomó una alícuota de 10 µL por triplicado. Todo el material utilizado fue lavado con agua desionizada y secado con acetona y calor, como también los reactivos se prepararon con agua desionizada y libre de fosfatos: (H₂SO₄ 10 N, H₂O₂ al 30%, urea 5%, molibdato de amonio 5%, mezcla de bisulfito de sodio anhidro al 15% y sulfito de sodio anhidro al 0.5% y reactivo de Fiske-Subarrow al 0.25%, que corresponde al ácido 1-

amino-2-nafol-4-sulfónico en solución de mezcla de sulfitos). Se agregaron 0.5 mL de H_2SO_4 y se incubaron a $230^\circ C$, durante 10 min, hasta que se obtuvo la digestión completa de la materia orgánica. Los tubos se dejaron enfriar, se les agregó una gota de H_2O_2 y se volvieron a calentar durante 5 min; se dejaron enfriar para añadirles una gota de urea al 5% para remover el exceso de peróxido; se calentaron nuevamente y, finalmente, se dejaron enfriar. Posteriormente, a los tubos se les añadieron 1.3 mL de agua y 0.4 mL de molibdato de amonio, se agitaron y se añadió 100 μL de reactivo Fiske-Subarrow. Se incubaron en un baño de agua a ebullición durante 7 min. La cuantificación de fosfatos se realizó a 830 nm (el color permanece estable no más de 45 min). Se elaboró una curva de fosfatos de 0.1 a 1.0 μg de fosfatos a las mismas condiciones. Para la conversión de mg de fósforo a mg de fosfolípidos (FL), el valor obtenido se multiplicó por 7.1 como factor de corrección (43, 110).

También se evaluó el efecto de *Spirulina* sobre la proporción de las lipoproteínas séricas, con el fin de indagar si existe alguna relación entre el hígado graso y el transporte de lípidos:

f) Determinación de lipoproteínas. Se llevó a cabo por medio de un sistema de gel de agarosa de Ciba-Corning, con un amortiguador de fosfatos a pH 8.6 y con una fuente de poder de 90 volts. Posteriormente, se efectuó una tinción de los geles con el colorante de lípidos rojo oleoso 7B y se determinaron para la interpretación automatizada en el densitómetro Beckman T 790 (5).

Se procedió a buscar otros efectos biológicos de *Spirulina*, en la patología del hígado graso inducido por CCl_4 , de manera que, con base a la reactividad de radicales libres triclorometilo que desencadena el CCl_4 sobre los lípidos celulares, se optó por cuantificar algunos productos

de la lipoperoxidación y evaluar el posible efecto antioxidante de *Spirulina*. Para ello, se determinaron dienos conjugados y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico SRATB (por sus siglas en inglés TBARS) en extractos lipídicos de la fracción microsomal de los hígados de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con CCl_4 a las 96 h postratamiento y a sus respectivos controles

g) Lipoperoxidación (SRATB). Para la determinación de SRATB se tomó una alícuota de 500 μL de lípidos, diluidos en 2 mL de MeOH (de 1 g de hígado). Enseguida se añadieron 100 μL de MeOH, 200 μL de HCl 0.6 N y 1 mL de ATB 0.12 M en tris(hidroximetil-aminometano) 0.026 M. Se llevó a baño María durante 10 min, los SRATB se determinaron a una longitud de onda de 535 nm. Se preparó una curva estándar bajo las mismas condiciones de experimentación, con 2.2-22 μg de tetra-etoxipropano (TEP), que equivalen a 0.72-7.2 μg de AM (aldehído malónico) (modificada de 99,124).

h) Dienos conjugados en microsomas. Fragmentos de alrededor de 1 g de hígado se homogeneizaron con 4 mL de solución de sacarosa 0.3 M con EDTA 3 mM preparada en baño de hielo; se centrifugó por 15 min a 600 x g (se eliminó la fracción nuclear); se recolectó el sobrenadante y se centrifugó a 9,000 x g durante 10 min; se recuperó el botón y se resuspendió con la solución de sacarosa; se eliminaron las mitocondrias y se recuperó el sobrenadante; se centrifugó a 94,000 x g durante 60 min; se desechó el sobrenadante y el botón se recuperó, siendo ésta la fracción microsomal. Los lípidos se extrajeron 2 veces con 10 mL de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1, v/v); se evaporaron bajo corriente de N_2 ; se resuspendieron en 5 mL de MeOH; se tomó una alícuota de 1 mL y, finalmente, se identificaron los dienos conjugados en UV en un espectrofotómetro de 190 a 230 nm (94, 124).

2ª Etapa

EVALUACIÓN *IN VIVO* DE *Spirulina maxima* ANTE EL DASFÍO DE UNA DOSIS SUBLETAL DE CCl₄ (2 mL/kg peso)

Con base en los experimentos anteriores, en donde se observó que una sola dosis de CCl₄ (1mL/kg) tiene su máximo efecto a las 96 h (114, 115), se duplicó la dosis de CCl₄ para disminuir el período experimental. Entonces, se realizó el experimento *in vivo* de igual manera que en la 1ª etapa con una dieta purificada (Tabla X) con y sin *Spirulina* entera al 5%, tomando en cuenta las mismas condiciones experimentales (métodos a, b, c y d), con la variable de que la dosis administrada fue de 2 mL/kg de peso.

En esta etapa se determinaron en suero, las aspartato aminotransferasa (AST) y los triacilgliceroles (TAG). En lípidos de hígado, se determinaron LT, TAG, CT (métodos e. 1 y e 2), ácidos grasos no esterificados totales (AGNE) (método j) y SRATB (método g).

Primero, se evaluó el daño hepático por medio de la determinación de las aspartato amino transferasas (AST) a los siguientes tiempos después de la inyección de CCl₄ (2 mL/kg de peso): 1, 6, 9, 24, 36 y 48 h, únicamente con el fin de encontrar cuál fue el tiempo de daño máximo con esa dosis de CCl₄.

i) Determinación de aspartato aminotransferasas (AST) . La cuantificación de las AST fue realizada con sus paquete enzimático (Merck, México, D. F.) el cual tiene el siguiente principio:

L-Aspartato+ 2-oxaloglutarato+ AST-----→ oxaloacetato + L-glutamato

Oxaloacetato + NADH + malato deshidrogenasa -----→ L-malato + NAD

En éste método se mide la velocidad de oxidación de NADH a NAD por medio de la medición

de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm cada 30 seg durante 2 min y se calculó la tasa de oxidación de NADPH por min ($\Delta A/\text{min}$) el cual es proporcional a la actividad de la AST, medido en un espectrofotómetro.

j) Determinación colorimétrica de ácidos grasos no esterificados totales (AGNE). Por medio de un paquete enzimático el cual está fundamentado en las siguientes reacciones:

AGNE + coenzima A (CoA) + ATP + Acil CoA Sintetasa \longrightarrow acilCoA + AMP + pirofosfato

AcilCoA + O₂ + Acil CoAoxidasa \longrightarrow enoilCoA + H₂O₂

H₂O₂ + 4-aminoantipirina + ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxi-benzóico + peroxidasa \longrightarrow 2H₂O + HBr + complejo colorido que absorbe a una longitud de onda de 546 nm.

En el concentrado de lípidos hepáticos se identificaron ácidos grasos por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) como se indica a continuación:

k) Identificación de ácidos grasos. El concentrado de lípidos de hígado se derivatizó con MeOH/H₂SO₄ (método I). Fueron inyectados en el CG-EM, separándose e identificándose los ácidos grasos de cada uno de los extractos lipídicos de hígado de rata.

L) Derivatización de lípidos. Los lípidos (500 μg) en 2 mL de una mezcla benceno/metanol (1:1, v/v), libres de humedad, se añadieron 100 μL de H₂SO₄ concentrado con el fin de obtener lípidos esterificados con un radical metilo con el propósito de ser separados por el cromatógrafo de gases e identificados por espectrometría masas. La "derivatización" se realizó en baño María durante 60 min. La reacción se detuvo con 1 mL H₂O destilada, se hicieron 3

extracciones sucesivas con hexano; las dos primeras se evaporaron y el tercer volumen recuperado se lavó con agua destilada (2:1, v/v), la fase acuosa se desechó y la hexanóica se le eliminó la humedad restante con Na₂SO₄ anhidro. Se concentraron bajo corriente de N₂ hasta aplicar al cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas CG-EM (89).

3ª Etapa

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD *IN VITRO* DE UN EXTRACTO POLAR L (DE *Spirulina maxima*)

Se evaluó el efecto antioxidante *in vitro* del extracto polar H₂O/EtOH (9:1, v/v) del alga (Diagrama 2), mediante la producción de SRATB (método g) en un sistema pro-oxidante, así como en hepatocitos de ratas sanas. Estos estudios evaluaron la dependencia del tiempo en la producción de SRATB y la dependencia de la concentración del extracto de *Spirulina* para disminuir la producción de SRATB.

Actividad antioxidante de *Spirulina* en hepatocitos

A continuación se presenta la metodología para la obtención de hepatocitos y las pruebas realizadas en éstos.

m) Aislamiento de hepatocitos. Se lavó el perfusor con agua destilada y posteriormente se colocó solución fisiológica Ringer-Krebs durante 15-20 min a 37.5°C aireada con corriente de carbógeno (CO₂ 5% y O₂ 95%). Ratas Wistar macho de 200-300 g, con 24 h de ayuno, se anestesiaron con éter dietílico; se hizo un corte en la región abdominal para dejar expuesto el hígado, se realizó una disección para exponer la vena porta, se cortó ligeramente para canularla con un catéter. El hígado se perfundió con 10 mL de colagenasa IV (1.6-2.0 mg/mL)

durante 6-10 min, hasta que se eliminaron los restos de sangre y se obtuvo un hígado suave. Ésto facilitó la disgregación de los hepatocitos. Éstos se filtraron en una doble malla de nylon y se recuperaron en solución Ringer-Krebs. Se lavaron tres veces con la misma solución para eliminar la colagenasa y finalmente se llevaron a 40 mL. Se recuperaron en promedio 1×10^6 células/mL, utilizando un contador de células Neubauer (10, 21).

m.1) Evaluación de SRATB en el curso temporal en hepatocitos. Se tomó una alícuota de 1 mL de hepatocitos aislados, se incubaron con 130 μ L de etanol (0.75 M) o con glucosa (0.75 M) y con 100 μ L de *Spirulina* (10 mg/ml) hasta completar 2 mL con amortiguador Ringer-Krebs (concentraciones finales para *Spirulina* 500 μ g/ml y 48.75 mM para etanol y glucosa). Las células se incubaron durante 30, 60 y 120 min a 37 °C, con los respectivos controles (hepatocitos sin sustrato), después de cada tiempo transcurrido, se les adicionó 50 μ L de TCA al 25%, se centrifugó a 4,300 x g por 15 min, se tomó una alícuota de un mL e inmediatamente se midieron las concentraciones de productos que reaccionan con el ATB (modificada de 99, 124).

m.2) Efecto de la concentración de la fracción liofilizada (L) sobre la producción de SRATB en hepatocitos. El estudio se realizó con respecto a la concentración del extracto de *Spirulina* colocando 125, 250 y 500 μ g/mL (como concentración final), después de 60 min de incubación a 37°C se determinaron SRATB como se describió anteriormente (modificada de 99, 124).

Evaluación *in vitro* con un sistema pro-oxidante

n) Este sistema se preparó utilizando como sustrato oxidable el aceite de maíz (50 μL), como sistema pro-oxidante $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeCl}_3$ a una concentración de 0.019 M y 0.043 M, (5 y 10 μL respectivamente) Se añadieron 200 μL de una solución al 2.5% en $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (9:1, v/v) del extracto (L) de *Spirulina maxima* además se comparó con un antioxidante biológico y otro químico, como son el acetato de tocoferol 0.28 M en $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:1, v/v) (80 μL) y el 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT), 1.13 mM en metanol (30 μL), respectivamente. El volumen de reacción se llevó a 3 mL con MeOH. Las concentraciones finales fueron las siguientes: H_2O_2 31 μM , FeCl_3 143.3 μM , acetato de tocoferol 7.47 mM, BHT 11.3 μM , *Spirulina maxima* 1.16 mg/mL y lípidos 1.66%. Se llevó a un baño de 40°C durante 90 min y se tomó una alícuota de un mL para cuantificar SRATB (124).

3.2 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE *Spirulina maxima*

ñ) **Extracción con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:1, v/v).** Se realizó en Soxhlet, a 60°C y protegido de la luz (45) El extracto (O) se concentró en rotavapor y bajo corriente de N_2 (Diagrama 1). El extracto orgánico se analizó en el CG-EM después de derivatizarlo, como se indica en el método L.

p) Al producto desengrasado de *Spirulina* (A) se le realizó un análisis proximal de acuerdo a la metodología de la AOAC (4).

q) **Extracción $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (90:10, v/v).** La reacción se realizó a 70 °C, durante 1, h con agitación continua (Diagrama 4). Se centrifugó durante 15 min a 4,380 x g. El sobrenadante se recuperó por decantación colectándose en viales color ambar, finalmente se liofilizó. Al

extracto liofilizado se le realizaron las siguientes pruebas:

q.1) A la fracción liofilizada se le realizó un análisis proximal (proteínas, fibra cruda, cenizas, humedad, lípidos y carbohidratos) de acuerdo con la AOAC (3, 4, 14).

q.2) Se hizo una extracción con cloroformo/metanol (2:1, v/v), para cuantificar lípidos totales y otra con acetona/metanol (7:3, v/v), a la cual se le realizó un espectro de absorción UV-VIS (270 a 790 nm) para identificar pigmentos.

q.3) Se determinaron carbohidratos totales por la técnica de fenol-sulfúrico AOAC (4).

q.4) Separación y determinación de peso molecular de proteínas de la fracción L. El extracto crudo liofilizado se preparó con NH_4SO_4 80% en agitación por 15 h, se centrifugó a 10,000 x g y se pasó por una columna de Sephacryl S-200-HR de 90 cm de longitud por 0.5 cm diámetro interno, la cual separó por peso molecular (5-250 kDa). Se obtuvieron fracciones de 3.5 mL a 21 mL/h, en las cuales se observaron valores de absorbancia a 280 nm y con base en los valores obtenidos, se concentraron en diferentes viales. Con estas muestras se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, bajo condiciones desnaturalizantes, en la cual se estimó el peso molecular de las proteínas obtenidas (55).

VII. RESULTADOS

EFFECTO BIOLÓGICO DE DOS DIFERENTES FRACCIONES DE *Spirulina maxima*.

Los resultados obtenidos sobre el efecto biológico de dos diferentes fracciones de *Spirulina maxima* fueron ya publicados en el artículo intitulado: "Studies on the effect of *Spirulina maxima* on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat" (ANEXO I) A continuación se presentan sus resultados.

VII.1 EFECTO DE *Spirulina maxima*, EN SUS FRACCIONES OLEOSA (O) Y DESENGRASADA (A) EXTRAÍDA CON $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (cfr. Diagrama 2) SOBRE EL HÍGADO GRASO

A continuación se presentan los cambios ocurridos en los lípidos hepáticos: lípidos totales (LT), colesterol total (CT), fosfolípidos (FL) y principalmente TAG de los grupos que han sido tratados con CCl_4 y alimentados con y sin *Spirulina*. En la tabal XI se observa un incremento de 27.2% y 31 5% en los lípidos totales en el grupo DNC con respecto a los grupos DOC y DAC respectivamente, lo cual está indicando que hay una esteatosis (cúmulo de lípidos en hígado), en este mismo parámetro se observa que en DO hay una diferencia de 17 1% más que en DOC, esta elevación se puede explicar por el aumento en la concentración de fosfolípidos que es de 7.2% promedio con respecto a DAC y DNC y 44.5 y 23% más que DN y DA respectivamente.

Si se compara la concentración de los TAG en el grupo DNC se observa un incremento de 63.7% y 85 5% más que los grupos DOC y DAC respectivamente, este es el cambio primordial donde se observa la actividad hepatoprotectora de *Spirulina*, ya sea

en la fracción orgánica (O) o en la fracción desengrasada (A), es decir, *Spirulina* en cualquiera de sus formas previno el cúmulo de triacilgliceroles hepáticos.

En lo que se refiere a la concentración de colesterol total, se tiene nuevamente una diferencia significativa, aumentando 72% en el grupo DNC con respecto a los dos grupos con *Spirulina* DOC y DAC (Tabla XI).

TABLA XI

EFFECTO DE LAS FRACCIONES OLEOSA Y DESENGRASADA DE *Spirulina maxima*, SOBRE LOS LÍPIDOS DE HÍGADO, EN RATAS CON HÍGADO GRASO INDUCIDO POR CCl₄, A LAS 96 h POSTRATAMIENTO

Tratamiento	Dieta	Lípidos totales (LT) ^a	Triacilgliceroles (TAG) ^a	Colesterol total (CT) ^a	Fosfolípidos (FL) ^a
Sin CCl ₄	DN	38.66 ± 2.61	1.30 ± 0.47	0.89 ± 0.20	16.57 ± 1.01
	DO	43.16 ± 1.86	1.19 ± 0.19	1.78 ± 0.37	27.32 ± 4.39 *
	DA	38.76 ± 2.17	1.03 ± 0.27	1.17 ± 0.49*	19.72 ± 4.68
Con CCl ₄	DNC	50.00 ± 4.60*	2.90 ± 1.05*	1.92 ± 0.40*	18.10 ± 3.38
	DOC	34.86 ± 2.50**	1.33 ± 0.10*, **	0.56 ± 0.08*, **	19.28 ± 3.67
	DAC	36.16 ± 3.60**	0.49 ± 0.20**	0.49 ± 0.14*, **	12.84 ± 2.91

DN= Dieta normal

DO= Dieta con extracto oleoso correspondiendo al 5% de *Spirulina* entera

DA= Dieta con *Spirulina* desengrasada correspondiendo al 5% de *Spirulina* entera

DNC= Dieta normal con CCl₄

DOC= Dieta con extracto oleoso y CCl₄

DAC= Dieta con *Spirulina* desengrasada y CCl₄

VALORES BASALES DN (0 h): LT 35.7±6.8, TAG 1.06±0.08 CT 0.34±0.12 y FL 22.3 ±5.12 mg/g de hígado

^a Valores expresados en mg/g hígado, representan la media ± SD, n=5,

* Diferencias significativas con respecto al grupo DA y ** diferencia significativa con respecto al grupo DAC p<0.05

Entonces, los grupos que fueron alimentados con *Spirulina*, en cualquiera de sus formas y tratados con CCl_4 (DOC y DAC), mostraron una concentración semejante o menor a los valores de las concentraciones basales de lípidos. La concentración de fosfolípidos permite detectar una posible forma por medio de la cual *Spirulina* podría proteger la membrana celular, pero ésto se comprobó cuando se obtuvieron los resultados de los experimentos que identificaron productos de la lipoperoxidación, los cuales se muestran en los estudios en el inciso VII.2, tablas XIII y XIV.

En la tabla XII se muestran las concentraciones de los lípidos de suero. El valor de la concentración de TAG en suero en el grupo DA fue significativamente mayor con incrementos de 62.3% y 73%, DO y DN respectivamente. Si DA se compara como control de DAC se observa una elevación de 62.8%, sin embargo, esta diferencia no se observó entre los grupos tratados con CCl_4 con respecto a su control DNC. En lo que respecta al CT, tampoco se observa diferencia significativa entre los grupos tratados con CCl_4 ; pero en los grupos sin CCl_4 se incrementó significativamente, particularmente las concentraciones del grupo DA con respecto a la dieta DO.

Todas estas diferencias en la concentración de los lípidos plasmáticos indujo a buscar ¿qué estará pasando con el transporte de los lípidos?, por lo que posteriormente se determinaron lipoproteínas en un experimento utilizando el alga completa. Estos resultados presentados en las tablas XI y XII concuerdan con el daño que produce el CCl_4 en el hígado y al planteamiento que se hacen los estudiosos del CCl_4 (83).

TABLA XII

EFFECTO DE LAS FRACCIONES OLEOSA (O) Y DESENGRASADA (A) DE *Spirulina maxima*, SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE TRIACILGLICEROLES Y COLESTEROL TOTAL EN SUERO DE RATA, A LAS 96 h POSTRATAMIENTO

Tratamiento	Dieta	Triacilgliceroles ^b (TAG)	Colesterol total ^b (CT)
Sin CCl ₄	DN	51.06 ± 9.8	67.99 ± 15.4
	DO	60.74 ± 24.0	56.54 ± 9.4*
	DA	168.81 ± 58.6 *	88.03 ± 9.8
Con CCl ₄	DNC	110.13 ± 40.0 *	78.38 ± 13.8
	DOC	103.8 ± 23.9	79.78 ± 13.6
	DAC	77.81 ± 6.0	73.60 ± 5.5

DN= Dieta normal

DO= Dieta con extracto oleoso correspondiendo al 5% de *Spirulina* entera

DA= Dieta con *Spirulina* desengrasada correspondiendo al 5% de *Spirulina* entera

DNC= Dieta normal con CCl₄

DOC= Dieta con extracto oleoso y CCl₄

DAC= Dieta con *Spirulina* desengrasada y CCl₄

VALORES BASALES DN (0 h):TAG 63.1±7.7 y CT 60.9±14.8 mg/dL

^b Valores expresados en mg/dL, representan la media ± SD, n=5

* Diferencia significativa con respecto a DN p<0.05

VII.2 OTROS EFECTOS BIOLÓGICOS DE *Spirulina maxima* QUE PUEDEN ESTAR ACTUANDO EN LA PROTECCIÓN DEL MODELO DE HÍGADO GRASO

VII.2.1 Identificación de dienos conjugados y productos finales de lipoperoxidación SRATB.

Estos experimentos se realizaron con el fin de buscar otra actividad biológica de *Spirulina* conjunta con su actividad hepatoprotectora. También, para identificar un posible mecanismo de acción de *Spirulina in vivo* Retomando la información dada en la introducción de éste trabajo sobre la toxicidad del CCl₄, los microsomas es el sitio donde se producen una gran cantidad de radicales que oxidan los lípidos, por lo que se identificaron algunos productos de la lipoperoxidación, en estos organelos: en la fase de

iniciación y en la fase de terminación de la lipoperoxidación como los dienos conjugados y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico respectivamente.

Los resultados se muestran en la tabla XIII donde se observa que en el grupo DNC, la absorbancia se incrementa 48.5% con respecto a su control DN y 64.4% con respecto a DSC. Los microsomas de hígados de ratas alimentadas con *Spirulina* DS y sin CCl₄ mostraron menor oxidación que los de las ratas alimentadas sin el alga.

TABLA XIII
DIENOS CONJUGADOS EN LOS LÍPIDOS MICROSOMALES DE RATAS
DESPUÉS DE 96 h DE POSTRATAMIENTO

GRUPO	DN	DS	DNC	DSC
Densidad óptica				
$\Delta A_{205 \text{ nm}}$	1.65	0.90	2.45	1.49

Espectro de UV de 190-320 nm

Valores representativos corregido por mg de muestra analizada

DN= Dieta normal, DNC= Dieta normal con CCl₄.

DS= Dieta con *Spirulina* DSC=Dieta con *Spirulina* CCl₄

En la tabla XIV también se observa la actividad antioxidante de *Spirulina*, en la que la concentración de SRATB en los grupos DS y DSC muestra diferencias significativas contra sus controles (DN y DNC) y en el grupo DNC se observa un incremento de 28%, con respecto a DSC en la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB).

TABLA XIV
EFFECTO DE *Spirulina maxima* SOBRE LOS VALORES DE SRATB,
EN LÍPIDOS MICROSOMALES A LAS 96 h DE TRATAMIENTO

GRUPO	DN	DS	DNC	DSC
μg SRATB/ g hígado	12 27±3.31	12 05±1.99	14 25±0.10 *	10 93±1 41

Valores que representan media ± SD, n=5

*Diferencia significativa con respecto a DN, p<0.05

DN= Dieta normal, DNC= Dieta normal con CCl₄,

DS=Dieta con *Spirulina* DSC=Dieta con *Spirulina* CCl₄

Estos resultados comprueban la actividad tóxica del CCl₄, como lo han reportado algunos autores (84, 93), pero principalmente se observa la actividad antioxidante de *Spirulina maxima* administrada por vía oral a las 96 h postratamiento con CCl₄

VII.2.2 Valoración de lipoproteínas en suero

En la tabla XV se observa que en el grupo DSC el contenido de lipoproteínas no fue modificado por el tratamiento con CCl₄, ya que se mantuvieron en los porcentajes observados en las ratas no tratadas con CCl₄, mientras que el grupo DNC mostró elevación de 17.8% en las lipoproteínas de muy baja densidad (LMBD) con respecto a DSC y una disminución de 16 6% en las lipoproteínas de alta densidad (LAD)

TABLA XV
EFFECTO DE *Spirulina maxima* SOBRE LOS VALORES DE
LIPOPROTEÍNAS EN SUERO

Tratamiento	Dieta	LAD %	LBD %	LMBD %
sin CCl ₄	DN	34 4±4.1	12 4±6 2	48 1±4.1
	DS	43.3±5.6 *	13.5±0.8	43.9±5.4
con CCl ₄	DNC	33 8±6.5	7.4±1.1*	57 2±7.0 *
	DSC	40 8±7.2 *	13.3±0.9	45.8±7.0

% de lipoproteína con la media ± SD, n=5

*Diferencia estadística significativa en cada una de las lipoproteínas con respecto al tratamiento

LAD: Lipoproteínas de alta densidad LBD: Lipoproteínas de baja densidad LMBD: Lipoproteínas de muy baja densidad

En cuanto a las lipoproteínas del grupo de ratas DSC se mantienen en sus niveles normales o basales a pesar de haber sufrido el desafío con CCl₄, es decir en el grupo alimentado con *Spirulina maxima* no se vio afectado el balance y proporción de las lipoproteínas plasmáticas, esto implica que *Spirulina* puede estar previniendo el daño microsomal y por lo tanto evitando el daño a la síntesis de proteínas y/o atenuando la lipoperoxidación de las membranas.

VII.3 EVALUACIÓN *IN VIVO* DE *Spirulina maxima* ANTE UN HEPATOTÓXICO A UNA DOSIS SUBLETAL (2 mL/kg peso)

VII.3.1 Tiempo máximo de daño hepático

Con base en experimentos anteriores, en donde se observó que una sola dosis de CCl₄ (1 mL/kg de peso, vía intraperitoneal) tiene su máximo efecto a las 96 h (114, 115), se decidió disminuir el tiempo de experimentación, con el fin de ahorrar materia prima y disminuir las diferencias debidas a la variabilidad biológica, por lo cual se administró CCl₄ en una sola dosis de 2 mL/kg de peso vía intraperitoneal. Por lo que se evaluó con respecto al tiempo el daño hepático por la medición de las aspartato amino transferasas (AST), donde el mayor daño celular estuvo entre las 24 y 48 h, en el cual se obtuvo un promedio de 1.039 ± 55 UI de AST.

VII.3.2 Daño hepático y actividad de *Spirulina maxima*

En la tabla XVI se observa que los valores que corresponden a la AST de ratas Wistar, con y sin *Spirulina*, a las 0, 24 y 48 h sin el tratamiento con CCl₄ difieren significativamente ($p < 0.01$) con respecto a las ratas tratadas con CCl₄

No obstante, entre los grupos DNC y DSC únicamente se observó diferencia significativa a las 48 h con un incremento de 35% en los animales que no recibieron *Spirulina*. En este modelo se observó que los TAG incrementaron significativamente a las 48 h después de la intoxicación con CCl₄, con un incremento de 82% con base en el promedio de los demás grupos.

TABLA XVI

EFFECTO DE *Spirulina* SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE AST Y TAG EN SUERO DE RATA TRATADAS CON CCl₄ (2 mL/kg de peso) Y ALIMENTADAS CON *Spirulina maxima*

GRUPO y h	UI de AST/dL	TAG mg/dL
DN 0	93 ± 24	87 ± 15
DS 0	115 ± 25	88 ± 18
DN 24	70 ± 15	63 ± 15
DS 24	80 ± 15	68 ± 20
DNC 24	1,444 ± 250**	51 ± 6
DSC 24	1,720 ± 470**	65 ± 12
DN 48	52 ± 9	75 ± 20
DS 48	56 ± 5	64 ± 14
DNC 48	2,367 ± 200**	**133 ± 15
DSC 48	1,292 ± 470**	97 ± 10

Valores expresados en UI de aspartato aminotransferasa (AST) y mg/dL Triacilgliceroles (TAG) ± desviación estandar n=5, p<0.05 ** Diferencia altamente significativa con respecto a los demás grupos sin tratamiento con el hepatotóxico. los recuadros sombreados identifican las diferencias significativas entre los grupos DNC y DSC a las 48 h DN= Dieta normal. DNC= Dieta normal con CCl₄. DS= Dieta con *Spirulina* DSC= Dieta con *Spirulina* CCl₄

En la tabla XVII se muestra la concentración de lípidos del extracto lipídico de hígado. La cantidad de LT se incrementó significativamente en todos los grupos que fueron tratados con CCl₄ con respecto a los niveles basales. En lo que se refiere a los TAG, se observa el desarrollo de hígado graso en ambos grupos tratados con CCl₄ a las 24 (DNC y

DSC) aumentó un 75.2%, promedio, con respecto a los valores de los grupos control (DN y DS a las 0 y 24 h). La diferencia más significativa con respecto a la dieta se observó a las 48 h en el grupo DSC, donde hay una diferencia de 49.8% con respecto a DNC 48 h, lo cual implica que *Spirulina* tiene su máximo efecto a las 48 h postratamiento.

También se observa que la concentración de ácidos grasos no esterificados (AGNE) se encuentra más elevada en el grupo DNC 48 que los del grupo DSC 48, esta concentración de ácidos grasos no esterificados podrá estar incrementada por la síntesis hepática o por una disminución de la β -oxidación como lo han propuesto algunos autores (83, 91).

TABLA XVII

ANÁLISIS DE LÍPIDOS DE HÍGADO DE RATAS TRATADAS CON CCl₄ (2 mL/kg de peso) Y ALIMENTADAS CON *Spirulina*

GRUPO alimentado	LT mg/g	TAG mg/g	AGNE mg/g	μ g TBARS/g	CTmg/g
DN 0	49 \pm 2	0.8 \pm 0.2	0.07 \pm 0.03	1.6 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2
DS 0	46 \pm 6	1.0 \pm 0.4	0.13 \pm 0.05	1.5 \pm 0.2	1.2 \pm 0.4
DN 24	36 \pm 7	0.8 \pm 0.4	ND	1.6 \pm 0.2	1.0 \pm 0.5
DS 24	37 \pm 6	0.7 \pm 0.2	ND	1.7 \pm 0.3	1.1 \pm 0.1
DNC 24	53 \pm 8	6.8 \pm 2.4**	0.24 \pm 0.1*	1.88 \pm 0.6	0.8 \pm 0.2
DSC 24	69 \pm 10*	7.4 \pm 1.3**	0.06 \pm 0.04	2.03 \pm 0.2	1.0 \pm 0.3
DN 48	41 \pm 5	1.2 \pm 0.3	0.02 \pm 0.01	1.5 \pm 0.26	0.9 \pm 0.4
DS 48	50 \pm 2	1.5 \pm 0.6	0.22 \pm 0.07*	1.8 \pm 0.4	1.4 \pm 0.3
DNC 48	70 \pm 7*	5.7 \pm 1.6**	0.61 \pm 0.2**	5.5 \pm 0.2**	1.4 \pm 0.5
DSC 48	66 \pm 11*	2.8 \pm 1.0*	0.27 \pm 0.1*	2 \pm 0.5	1.5 \pm 0.4

DN= Dieta normal, DNC= Dieta normal y tratado con CCl₄,

DS=Dieta con *Spirulina*. DSC=Dieta con *Spirulina* tratado con CCl₄ a las 0, 24 y 48 h

LT: lípidos totales, TAG: triacilgliceroles, CT: colesterol total, AGNE: ácidos grasos no esterificados

SRATB: representa a los productos estables de lipoperoxidación

Los valores representan la media \pm desviación estandar, n=5.

*significativo y ** altamente significativo con respecto a sus controles p<0.05.

Los recuadros identifican la diferencia significativa entre los grupos DNC y DSC a las 48 h en cuanto a TAG, AGNE y SRATB.

ND: no detectados

En la tabla XVIII se presentan los ácidos grasos hepáticos los cuales fueron identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) de cada uno de los grupos experimentales. En esta tabla se observa principalmente que en todos los grupos se encuentran en mayor proporción los siguientes ácidos grasos: El ácido palmítico (16:0), el esteárico (18:0) y el oleico (18:1). En los grupos alimentados con *Spirulina* se observó una mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente el ácido linoleico (18:2); además, se detecta que atenúa ligeramente la concentración de los ácidos grasos saturados. Todos los grupos tratados con CCl₄ presentaron compuestos diferentes de los ácidos grasos, de los cuales se identificaron sus pesos moleculares.

Este último estudio donde se incrementó la dosis a 2 mL/kg de peso, se observó que *Spirulina* protegió o evitó el cúmulo de los triacilgliceroles en un 48% a las 48 h postratamiento, pero si se compara con los primeros estudios realizados y mencionados en los antecedentes, donde se utiliza 1 mL/kg peso, la protección que ejerce *Spirulina* fue de 78.6% a las 96 h postratamiento (114).

TABLA XVIII

EVALUACIÓN CUALITATIVA Y PORCENTUAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE HÍGADOS DE RATAS ALIMENTADAS CON *Spirulina maxima* Y TRATADAS CON CCl₄

GRUPO alimentado	% Ac. grasos saturados		% Ac. grasos insaturados		% Otros compuestos
DN 0	16:0	29.0	16:1	8.4	ND
	18:0	51.8	18:1	8.2	
			20:4	2.6	
DS 0	16:0	24.8	18:1	49.3	ND
	18:0	23.8	18:2	2.1	
DNC 24	16:0	40.0	18:1	18.0	18-29
	18:0	18.5			
DSC 24	16:0	45.1	18:1	6.0	4.6
	18:0	25.6	18:2	18.7	
DN 48	16:0	32.2	20:4	8.7	ND
	18:0	61.3			
DS 48	16:0	19.8	20:4	20.2	ND
	18:0	59.0	22:1	1.6	
DNC 48	16:0	45.5	18:1	20.4	5.4
	18:0	25.0			
	20:0	4.4			
DSC 48	16:0	52.6	12:1	2.2	ND
	18:0	14.0	18:1	23.4	
	19:0	0.26	18:2	5.3	
	22:0	0.27	18:3	0.31	
	24:0	0.78	20:1	1.2	
		21:1	0.24		
		20:4	0.49		

ND: No determinada

DN= Dieta normal, DNC= Dieta normal y tratado con CCl₄

DS=Dieta con *Spirulina* DSC=Dieta con *Spirulina* tratado con CCl₄ a las 0, 24 y 48 h

VII.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE UN EXTRACTO POLAR DE *Spirulina maxima* EN UN MODELO *IN VITRO*

El liofilizado obtenido de la extracción con (H₂O/EtOH, 9:1 v/v) (Diagrama 3) se evaluó *in vitro*: En hepatocitos y en un sistema pro-oxidante.

VII.4.1 Curso temporal de la producción de SRATB en hepatocitos aislados.

El curso temporal de la producción de lipoperóxidos por hepatocitos incubados en presencia de glucosa (48.75 mM) mostró un incremento hasta los 60 min de 14%, para posteriormente disminuir a los 120 min (Figura 1). Los hepatocitos incubados en presencia de *Spirulina* (250 µg/mL) mostraron una menor concentración de lipoperóxidos a los 30 min; sin embargo, dicha diferencia no fue observada en los tiempos posteriores.

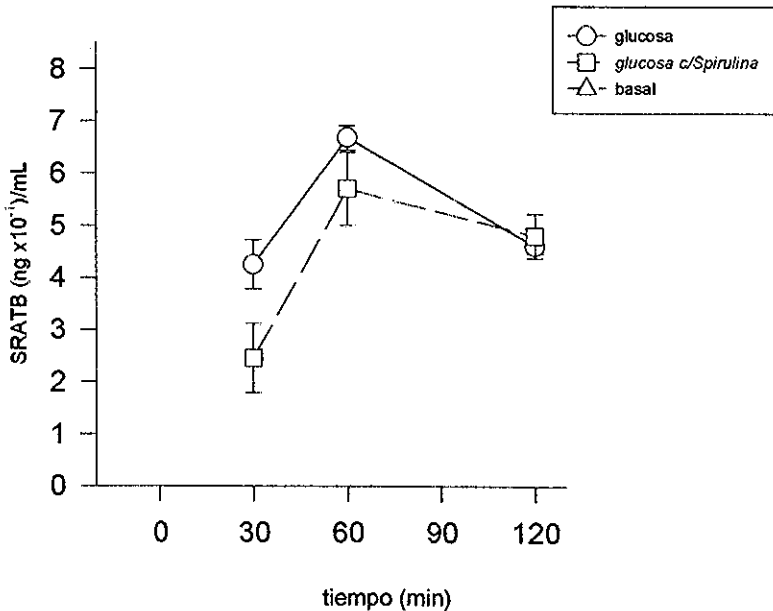


Figura 1. Efecto de *Spirulina* (extracto L) sobre el curso temporal (30, 60 y 120 min de incubación a 37°C) de la producción de lipoperóxidos en hepatocitos aislados e incubados con glucosa (48.7 mM). El trazo superior (círculos abiertos) corresponde a hepatocitos incubados en ausencia de *Spirulina* mientras que el trazo inferior (cuadros abiertos) corresponde a los valores obtenidos en presencia de *Spirulina* (250 µg/mL)

El curso temporal de el cúmulo de lipoperóxidos por los hepatocitos incubados en presencia de etanol (48.75 mM) mostró inicialmente valores más altos que los obtenidos en presencia de glucosa (Figura 2), pero no fueron diferentes por la presencia de *Spirulina*. No obstante, a los 60 min las diferencias entre ambos grupos fueron significativas incrementándose 47% sin *Spirulina*, aunque a los 120 min desapareció dicha diferencia, lo cual indica que el máximo efecto se encuentra a los 60 min

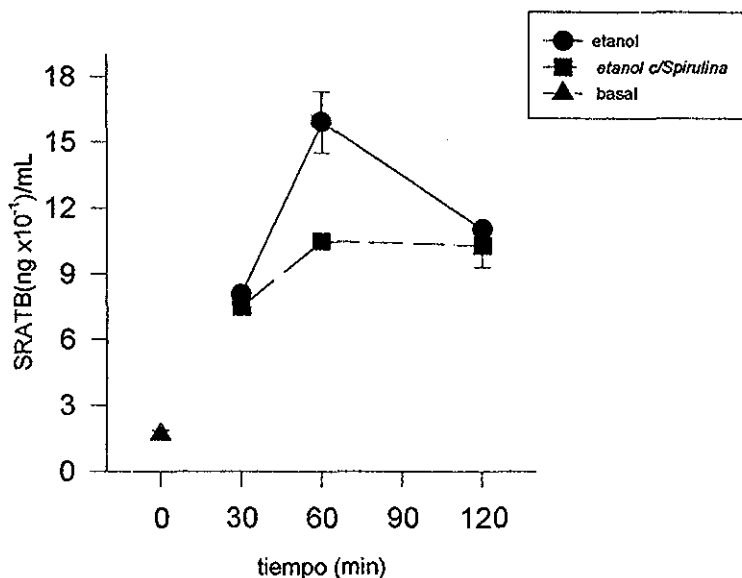


Figura 2 Efecto de *Spirulina* (extracto L) sobre el curso temporal de la producción de lipoperóxidos en hepatocitos aislados e incubados con etanol. El trazo superior (círculos cerrados) corresponde a hepatocitos incubados en ausencia de *Spirulina*, mientras que el trazo inferior (cuadros cerrados) corresponde a los valores obtenidos en presencia de *Spirulina*. Los resultados corresponden con una concentración final de 250 µg/mL de *Spirulina*.

VII 4.2 Dependencia de la concentración de *Spirulina maxima* (extracto L) sobre la producción de TBARS en hepatocitos aislados.

Se observa una tendencia a disminuir las SRATB inversamente proporcional a la concentración de *Spirulina* con y sin etanol, pero se observa especialmente en los hepatocitos tratados con etanol: si se compara la máxima dosis 500 μg contra 125 y 250 μg de *Spirulina* el decremento en SRATB es de 62.5% y 25.3% respectivamente, lo cual indica la actividad antioxidante de éste extracto es más potente dependiendo de la concentración

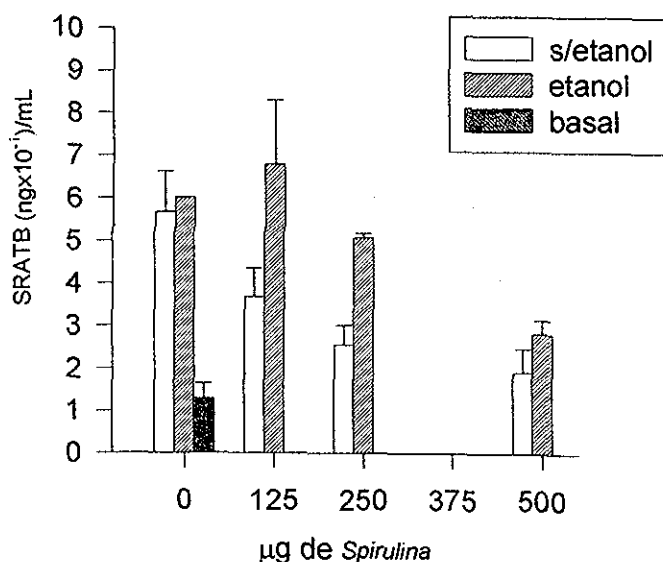


Figura 3. Dependencia de la concentración de *Spirulina* (extracto L) sobre la producción de lipoperóxidos como SRATB en hepatocitos aislados e incubados sin etanol (barra abierta) o con etanol 48.7 mM (barra cerrada) a los 60 min tratados con *Spirulina* con tres diferentes dosis (125 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

VII 4.3 Valoración del efecto antioxidante de *Spirulina* en un sistema pro-oxidante.

En la tabla XIX se observan los valores de concentración de los SRATB en los cuales fue significativamente mayor en ausencia de *Spirulina* para los tres grupos, es decir hay mayor lipoperoxidación

TABLA XIX

EFFECTO DE *Spirulina* SOBRE LA FORMACIÓN DE TBARS EN UN SISTEMA PRO-OXIDANTE^a

ANTIOXIDANTE	SRATB ($\mu\text{g/mL}$)
Sin antioxidante	188.0 \pm 21.0
BHT	17.6 \pm 2.0 **
Vitamina E ^b	57.9 \pm 1.6 **
Extracto de <i>Spirulina</i>	66.9 \pm 0.5 **

^a H₂O₂/FeCl₃ (19mM/43mM), como sustrato oxidable: Aceite de maíz, incubados durante 1 h en baño María. BHT=2,6-di-ter-butil-3-metilfenol (1.13 mM). ^bAcetato de Tocoferol (0.28 M), Extracto (L) de *Spirulina* 0.015%. Valores de sustancias reactivas con el ATB representados como media \pm SD μg malondialdehido MDA, n=6 **denota un valor de p < 0.01 con una diferencia altamente significativa.

Se observa que *Spirulina* previene 66.3% de la lipoperoxidación, la vitamina E protegió un 70.6%, y el BHT protegió un 90.6%, por tanto el antioxidante más potente fue el antioxidante químico (BHT), pero se observa claramente que *Spirulina* tiene un poder antioxidante semejante a la vitamina E.

VII. 5 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN PARCIAL DE EXTRACTOS DE *Spirulina maxima* BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS

5.1 Cuantificación del contenido químico proximal del residuo desengrasado (A) con (CHCl₃/MeOH 3:1,v/v).

En la siguiente tabla se dan los valores correspondientes al contenido de macronutrientes: la proteína se ve incrementada con respecto a la proteína original de *Spirulina* entera (Tabla I), debido a que se ha concentrado por la extracción de la fracción orgánica.

TABLA XX
ANÁLISIS PROXIMAL DEL EXTRACTO
DESENGRASADO (A)

	%
	base seca
Proteína cruda	63.7
Cenizas	10.4
Fibra cruda	1.0
Carbohidratos	24.9

VII 5.2 Separación de lípidos del extracto (O) (CHCl₃/MeOH 3:1, v/v)

Identificación de ácidos grasos

Del extracto crudo CHCl₃/MeOH se obtuvo 14.5% del total de *Spirulina*. A continuación se presenta los valores de la determinación de ácidos grasos del extracto orgánico derivatizado (O) (Tabla XXI).

TABLA XXI
ACIDOS GRASOS OBTENIDOS DE LA FRACCIÓN (O) DE *Spirulina*

tr	ácidos grasos	nomenclatura	PM	abundancia (%)
14.5	palmitoleico	16:1	268	13.2
14.8	palmitico	16:0	270	66.2
16.9	linolénico	18:3	292	6.2
17.1	linoleico	18:2	294	11.1
17.4	esteárico	18:0	298	1.3
19.9	araquidónico	20:4	318	2.2

63% de los lípidos son ácidos grasos identificados por medio de la derivatización directa del extracto crudo (O) por medio de CG-EM tr: tiempo de retención PM: peso molecular

VII 5.3 Extracción polar de *Spirulina maxima* (fracción L, Diagrama 2).

VII 5.3.1 La fracción (L) tuvo un rendimiento promedio de 20.2 % y en la tabla XXII se muestran los valores del análisis proximal.

TABLA XXII
ANÁLISIS PROXIMAL DE LA FRACCIÓN LIOFILIZADA (L)

	% base seca
Proteína	36.5
Extracto CHCl ₃ /MeOH	4.9
Cenizas	25.6
Fibra Cruda	0.9
Carbohidratos	32.1

En este extracto L se observa que a pesar de haber sido extraído con H₂O/EtOH (9:1 v/v), aún se encuentra una fracción orgánica o clorofórmica esto es debido a que este sistema de disolventes arrastra pigmentos y/o compuestos que tienen esa polaridad. El contenido de cenizas y carbohidratos, se observa que es más alto con respecto a *Spirulina* entera (Tabla I), debido a que se concentraron sus componentes polares.

VII.5.2.2 El liofilizado se trató con acetona/metanol 7:3 (v/v), a la fracción obtenida se le realizó un barrido UV-VIS, como se observa en la figura 4.

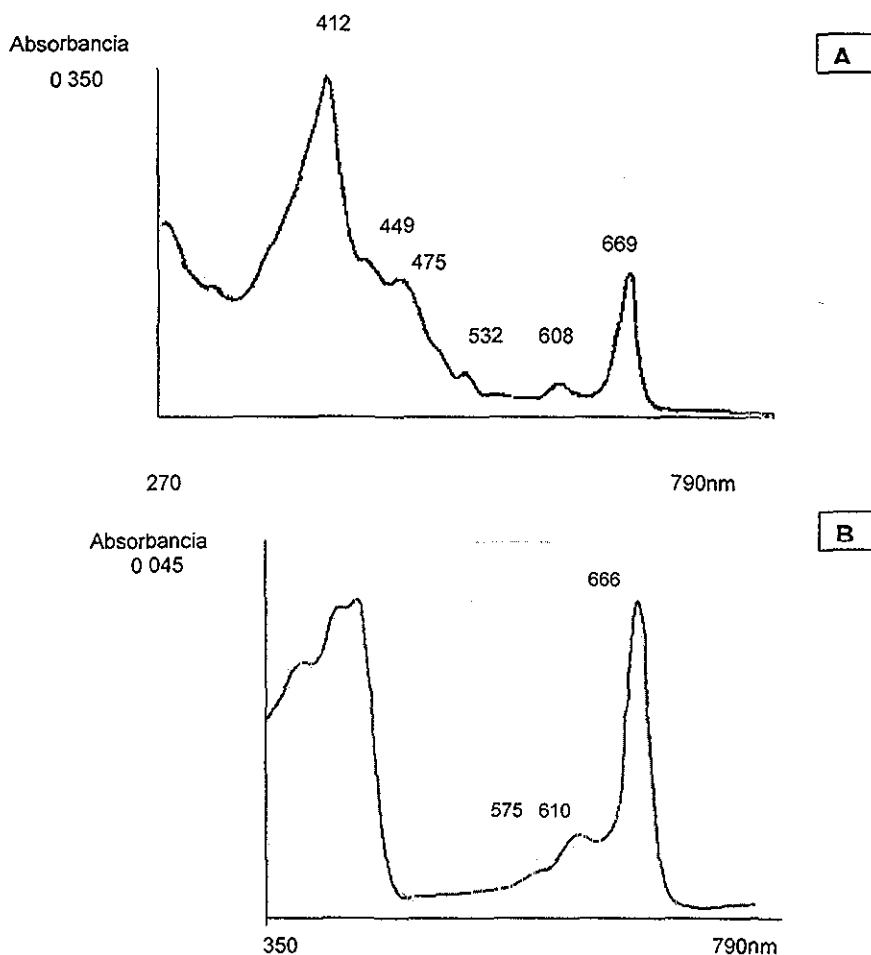


Figura 4. Panel A, espectro UV-VIS de 270 a 790 (metanol) de la extracción acetona/metanol 7:3 (v/v). El β -caroteno (449 y 475 nm); la clorofila 'a'.el espectro obtenido concuerda con los picos máximos están en 409-429 y 660-669 y otros en 531. 570-577 y 610 (126) Panel B estandar de clorofila 'a' realizado en las mismas condiciones

VII 5.2.3 Separación por peso molecular de proteínas del extracto L

Al separar el extracto polar por medio de la columna ya mencionada en la metodología, se obtuvieron 52 tubos de 3.5 mL, a los cuales se les midió la absorbancia a 280 nm, longitud de onda donde comúnmente se detecta la presencia de proteínas, como se observa en la figura 5.

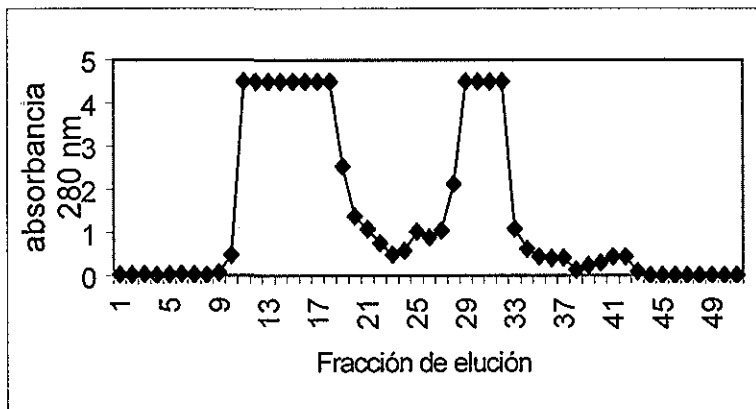


Figura. 5 Lecturas a 280 nm de los viales recuperados en la elución del extracto polar liofilizado L
Concentrado PA: fracciones de elución del 11-19
Concentrado PB: fracciones de elución del 20-27
Concentrado PC: fracciones de elución del 28-32
Concentrado PD: fracciones de elución 33-39

Se recuperaron y se concentraron 4 fracciones, marcándolas con las siguientes etiquetas PA, PB, PC, PD de acuerdo a la absorbancia medida, a las cuales se les identificó su peso molecular por medio de una electroforesis en gel de acrilamida.

En esta figura se puede identificar que la mayor concentración de proteínas se encuentra en las fracciones PA y PC observándose un máximo de 4.5 de absorbancia.

Gel electrofórico No.1

carril	3	5	6	7	8	9	10
muestra	a)	PA	PB	b)	PC	a)	PD

a) extracto H₂O/EtOH 9:1 (v/v)

b) marcador de peso molecular de 36-205 kDa

PA, PB, PC, PD: corresponden a los concentrados de las fracciones obtenidas en la columna

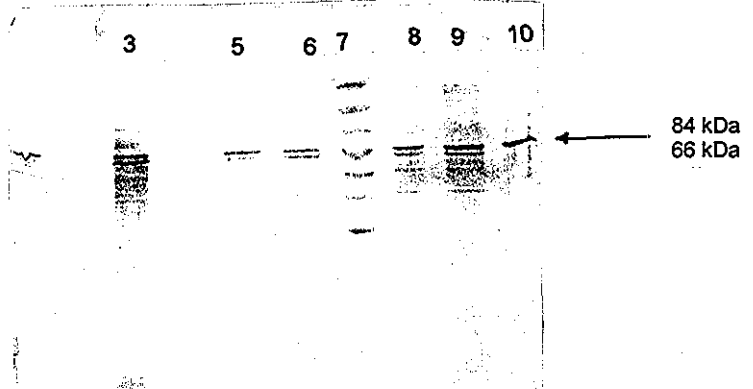


Figura. 7 Electroforesis correspondiente a las fracciones recolectadas en la columna. En el carril 10 se observa que la muestra, está semipurificada correspondiendo a un peso molecular 66kDa.

Gel electrofórico No. 2

carril	4	8	10
muestra	Fracción desengrasada (A)	extracción H ₂ O/EtOH (L) concentrada	extracción H ₂ O/EtOH (L) diluida

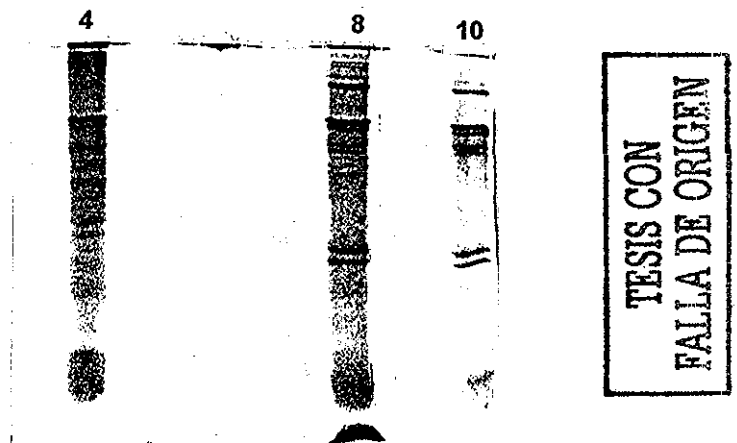


Figura. 8 Electroforesis correspondiente a la fracción desengrasada (A) y al extracto liofilizado (L). En este gel únicamente se comparan dos fracciones, donde el extracto (L) tiene las mismas proteínas de mayor peso molecular comprendidas en la fracción (A)

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1 ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS A y O DE LA *Spirulina maxima*

Las expectativas del efecto protector de *Spirulina* sobre el desarrollo de hígado graso se observaron *in vivo*, tanto con la fracción orgánica (O) como con la desengrasada (A).

Las variaciones significativas encontradas en los valores de lípidos totales y triacilgliceroles hepáticos en el grupo DNC con respecto a su control DN, demostraron que la dosis utilizada de CCl₄ (1 mL/kg peso en una dosis) provocó hígado graso, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por otros investigadores (58)

En los grupos alimentados con cada una de las fracciones obtenidas de *Spirulina* y tratados con CCl₄ (DOC y DAC), se observó que en ambas fracciones (A y O) hubo efecto hepatoprotector, mostrado específicamente en la concentración de LT y TAG hepáticos, lo cual implica que los compuestos hepatoprotectores de *Spirulina* se encuentran en ambas fracciones ya que el incremento que se observa en DNC con respecto a DOC y DAC en cuanto a triacilgliceroles es de 63.7% y 85.5% respectivamente, si estos resultados se comparan con los obtenidos donde la diferencia fue de 80% cuando se administró *Spirulina* con respecto al grupo únicamente tratado con CCl₄ (115), estos incrementos en ambos experimentos implica una actividad posiblemente sinérgica o bien se podría pensar que la mayor actividad se encuentra en la fracción desengrasada (A) de *Spirulina*, es decir su actividad se ve más concentrada. La actividad en la fracción orgánica (O) se observa un efecto representativo, en todos los lípidos, especialmente en el incremento de la concentración de fosfolípidos hepáticos en el grupo DO y DOC, quizá pueda deberse a la

riqueza de ácidos grasos que contiene *Spirulina*, los cuales podrían estimular la síntesis de fosfolípidos e incorporarse a la membrana.

Se ha encontrado efecto hepatoprotector en un extracto heptanólico, de una leguminosa oriental que contiene esteroides y antraquinonas (11). En otros estudios se encontró actividad antioxidante en un extracto metanólico derivado de un residuo desengrasado con éter etílico de *Spirulina maxima*, y se atribuyó el efecto al β -caroteno (75). Por lo anterior, el efecto hepatoprotector del extracto apolar (O) utilizado en el presente estudio quizá pueda deberse a sus carotenoides, vitamina E, algunos ácidos grasos como el linolénico o algunos fitoesteroles (17, 56).

Por otra parte, se ha mostrado que la ficocianina, una proteína (125) de *Spirulina platensis*, tiene efecto hepatoprotector cuando se administra por vía intraperitoneal (12). Esta proteína está presente en la *S. maxima*, por lo que se podría pensar que el efecto hepatoprotector de la fracción desengrasada (A) se debió ésta. Además se ha demostrado que *Spirulina maxima* contiene proteínas con alta concentración de grupos sulfhidrilo, así como glutatión y glutatión reductasa (96). Gitler et al ha sugerido que la proteína con alto contenido de cisteínas (-SH) es capaz de regenerar al glutatión oxidado celular (GSSG), como se muestra en la siguiente reacción (50):

proteína-SH + GSSG (glutatión oxidado)----->proteína-S-SG + GSH (glutatión reducido).

Además, Ciccolli demostró que al administrar GSH, disminuyen los triacilgliceroles en hígado en ratas intoxicadas con CCl_4 (16). También, se ha demostrado que los aminoácidos y péptidos con grupos sulfhidrilo (-SH) tienen un efecto antioxidante (74). Con base en lo referido, se podría especular que el efecto hepatoprotector de la fracción (A) pueda deberse a su proteína.

Los efectos bioquímicos y químicos que se han podido observar a lo largo de las determinaciones han sido significativamente diferentes con respecto a sus controles; es decir, se ha comprobado que ambas fracciones presentan efectos hepatoprotectores.

En general, los organelos celulares más dañados por la intoxicación son los microsomas, donde se encuentran un gran número de enzimas que metabolizan las drogas y/o tóxicos, por lo que es el blanco para detectar compuestos de iniciación y de terminación de la oxidación (49, 82, 83) En las tablas XIII y XIV se puede apreciar tanto la toxicidad del CCl_4 , como la actividad antioxidante de *Spirulina maxima in vivo* impidiendo la formación de dienos conjugados y productos finales de lipoperoxidación, que pueden ser debidos a un efecto sinérgico de antioxidantes que contiene *Spirulina* destacando los carotenoides, Vitamina E y selenio. Así como la participación de los aminoácidos azufrados y tampoco se descarta la actividad del ácido linolénico en el metabolismo de los lípidos

Por la riqueza nutrimental que contiene *Spirulina maxima* (Tablas II-VIII) y la actividad biológica que ha demostrado en este trabajo se podría pensar que es capaz de atenuar los daños producidos por el CCl_4 , conservando las lipoproteínas séricas en los niveles basales cuando hay daño inducido por CCl_4 . Los resultados obtenidos indican que la síntesis acelerada de triacilgliceroles es inhibida por *Spirulina*, la cual se refleja en un aumento en la producción de LAD y una disminución en las LMBD, mientras que los niveles de LMBD en el grupo DNC aumentaron un 18.75%. Entre los daños bioquímicos causados por la intoxicación por CCl_4 , reportados por otros autores, se encuentra la pérdida de la capacidad del hígado para la formación y excreción de las lipoproteínas LMBD (33, 48) lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

llama la atención, ya que *Spirulina* contiene una gran riqueza de ácidos grasos poliinsaturados y en particular el linolénico de gran importancia en el metabolismo como ya se ha mencionado antes (18, 126); además, es importante destacar que la rata no sintetiza ácido linolénico el cual aparece en los lípidos de hígados (44)

VIII. 2 ACTIVIDAD DEL EXTRACTO POLAR (L) DE *Spirulina maxima*

Las reacciones de los compuestos orgánicos con el oxígeno atmosférico son importantes en los sistemas químicos, la respiración y la combustión son los más conocidos, pero un proceso menos espectacular nos conduce a una degradación por otro tipo de oxidación, muchos de estos procesos ocurren de manera espontánea, es decir como autooxidante y otras veces por un agente externo (8). Durante el curso de este trabajo se ha confirmado la actividad antioxidante de *Spirulina maxima*, por eso, utilizando una fracción polar de *Spirulina* en un modelo *in vitro*, empleando hepatocitos, se ha podido detectar nuevamente la actividad antioxidante, pero en éste se utilizó como un sustrato tóxico metabolizable y con idea de extrapolar a lo que sucede *in vivo* el efecto de *Spirulina*. Los hepatocitos, como células capaces de defenderse de los agentes externos, han manifestado junto con *Spirulina maxima*, impedir el daño causado por el etanol, el cual genera radicales libres que se autopropagan formando sustancias estables que reaccionan con SRATB. Los resultados que presenta la tabla XX, donde se observa el efecto del etanol, manifiestan que *Spirulina* atenúa ligeramente la lipoperoxidación, lo que concuerda con la menor producción de dienos conjugados mostrados en el modelo *in vivo*.

Otros autores han probado extractos de plantas en las que se ha observado un efecto protector en extractos polares, los autores sugieren que el efecto puede deberse a algunas quinonas y/o a oligosacáridos que poseen las hojas de algunas plantas (57, 111).

Entonces, la respuesta antioxidante podría deberse a algunos polisacáridos (134, 136), una quinona, una proteína o algún péptido o bien a algún terpeno (130). Los resultados indican que su actividad puede deberse a compuestos en la *S. maxima*, que tienen un peso molecular pequeño, de tal forma que al entrar a la célula la protejan del ataque oxidante, o bien, compuestos que por su poder antioxidante protegen la membrana citoplásmica, sin entrar a ésta, atrapando radicales libres que provocan la lipoperoxidación. También, algún polisacárido que se uniera a la membrana y fuera capaz de disparar una respuesta de protección, como se ha demostrado con un extracto acuoso de *Spirulina platensis*, llamado Calcium Spirulan, el cual contiene carbohidratos, proteína y calcio, (54) También se ha demostrado que los carbohidratos protegen del ataque viral *in vitro*, en particular inhibiendo la replicación del HIV-I (134, 136) y la ficocianina como hepatoprotector (12).

El efecto de *Spirulina* es semejante al de la vitamina E, en las mismas condiciones experimentales, ya que tiene la capacidad de detener las reacciones finales de oxidación en un sistema pro-oxidante (82)

VIII.3 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS DE *Spirulina maxima*

Análisis proximal del residuo desengrasado con CHCl₃/MeOH (A)

Este extracto fue caracterizado mediante un análisis proximal y por medio de un fraccionamiento y analizado por CG-EM, en el cual el contenido de proteínas del extracto (A) es 6.11% mayor que la proteína de *Spirulina* entera (133); como se esperaba, todos los parámetros incrementaron, pero el de proteína fue mayor. Esto indica que el rendimiento de

proteínas únicamente fue más alto por la concentración del extracto al haber eliminado los lípidos.

Separación de lípidos del extracto (O)

La extracción en Soxhlet con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:1, v/v) es un sistema apropiado para material biológico, el cual tiene la ventaja de que los lípidos se obtienen en su totalidad (lípidos polares y no polares), pero con la desventaja de que los disolventes son muy tóxicos. El producto (O) se conservó seco, libre de disolventes y en atmósfera de N_2 , para utilizarlo en los estudios biológicos y químicos.

Las extracciones que se realizaron posteriormente se efectuaron empleando acetona al 100%, la cual es menos agresiva que el sistema anterior (cfr. Anexo II)

Se lograron identificar los ácidos grasos de este extracto, los cuales aparentemente contienen un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados que lo reportado por otros autores (56, 97). En los resultados que se obtuvieron, se muestra en el presente trabajo en la tabla XXI, donde se observa que la mayoría de los ácidos grasos se encuentran dentro del intervalo de concentración reportado, excepto el ácido palmítico, el cual difiere un 21.09% y el linolénico 1.46% del límite inferior de lo reportado por Hudson (56). Así mismo, la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados también fue mayor a la reportada, (Tabla V). Ello puede deberse a que la diferencia en el contenido de nutrientes, y, en particular de ácidos grasos está influenciada por el tipo de cosecha, año y estación que fue colectada esta alga (17), o bien al método que usó Hudson para identificar los ácidos grasos de *Spirulina*, cromatografía en capa fina (CCF), el cual no es un método cuantitativo óptimo

VIII.4 ANÁLISIS DEL EXTRACTO POLAR L (H₂O/EtOH 9:1, v/v)

Al determinar el contenido proximal de este extracto se encontró que contiene 40.6% menos de proteína que el extracto (A), pero en el gel se observó que la mayoría de las proteínas que se encuentran en la fracción (A) son las mismas en el extracto (L), pero en menor concentración; es decir, la proteína soluble fue extraída con H₂O/EtOH (9:1, v/v), esta proteína común podría ser la responsable de la actividad antioxidante *in vivo* en *Spirulina* entera y en la desengrasada e *in vitro* en el extracto (L). Con este experimento se puede decir que es posible que las proteínas de las fracciones (A) y (L) están presentes en el proceso de antioxidación tanto *in vivo* como *in vitro*

También se observó en el examen proximal un 60.9% más de cenizas que en el extracto (A), ésto implica una gran cantidad de minerales, los cuales podrían tener actividad antioxidante o incrementar la actividad antioxidante del sistema endógeno de la célula.

En lo que se refiere a los pigmentos encontrados en el espectro de absorción UV-VIS se pudieron identificar carotenoides y clorofila (figura 4 y tabla XXIII): con base en los estándares de pigmentos y compuestos coloridos (109), hay concordancia en cuanto menos 2 máximos de absorción típicos, lo cual se propone que entre los pigmentos contenidos en el extracto (L) se encuentra el β-caroteno (449 y 475 nm); en cuanto a la clorofila 'a' el espectro obtenido concuerda con los picos máximos están en 409-429 y 660-669 y otros en 531 y 570-577 (137) y con el estándar realizado en el laboratorio.

Por otro lado se ha encontrado en espectros de absorción VIS las longitudes de onda a las cuales se absorben las proteínas unidas a su pigmento como: ficobiliproteínas

(ficocianina 610-620, ficoeritorcianina 540-570 y aloficocianina 650-655), complejo ficocianina-aloficocianina 662-668, conjugado en 666 (125), los espectros realizados en este trabajo coinciden además con éstas longitudes de onda y con el tipo de espectro de la aloficocianina.

IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

IX. 1 CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta investigación pueden considerarse en dos vertientes, las bioquímicas y las químicas:

IX.1.1 Bioquímicas

1. El extracto oleoso y la fracción desengrasada ejercen un efecto hepatoprotector *in vivo* ante el desafío con CCl_4 (1 mL/kg de peso) ya que no hay incremento de triacilgliceroles y lípidos totales en hígado.
2. El extracto oleoso y la fracción desengrasada atenúan, *in vivo*, la elevación de triacilgliceroles plasmáticos con el tratamiento con CCl_4 (1 mL/kg de peso).
3. La fracción oleosa (O), la fracción desengrasada (A), y la *Spirulina* entera tienen un efecto antioxidante *in vivo* con el mismo tratamiento (CCl_4 1 mL/kg de peso).
4. La *Spirulina maxima* modera el transporte de lípidos, manteniendo a los niveles normales las concentraciones de lipoproteínas cuando el hígado ha sido dañado con CCl_4 .
5. La *Spirulina maxima* atenúa el daño hepático ante una dosis de CCl_4 de 2 mL/Kg peso, atenuando la elevación de las aminotransferasas y de triacilgliceroles hepáticos, es decir observándose un efecto hepatoprotector.

- 6 El extracto H₂O/EtOH de la *Spirulina* conserva el efecto antioxidante observado con la *Spirulina* entera. La evaluación *in vitro* del efecto antioxidante puede ser útil para el seguimiento de los principios activos.
- 7 La fracción polar extraída con H₂O/EtOH (9:1, v/v) tiene un efecto *in vitro* antioxidante dependiente de la dosis y dependiente del tiempo, de igual manera se observa este efecto cuando se trata ante un sistema pro-oxidante. El efecto antioxidante fue similar, en intensidad, al de la vitamina E.
- 8 Con base a lo demostrado en este trabajo, el efecto antioxidante y hepatoprotector de la *Spirulina* máxima podrá deberse al efecto de algunas de sus proteínas, vitaminas, a sus pigmentos y/o a sus ácidos grasos.

IX.1.2 Químicas

- 1 El extracto CHCl₃/MeOH (O) contiene gran proporción de ácidos grasos, los cuales se identificaron individualmente. Los más abundantes son: el ácido palmítico (16:0), 66%; el palmitoleico (16:1), 13.2%, el linoleico (18:2), 11%, el linolénico (18:3), 6.2% y el araquidónico 2.2%.
- 2 En la fracción desengrasada (A) se encontró un alto contenido de proteínas, principalmente.
- 3 En el extracto liofilizado polar se encontraron compuestos con alto contenido de cenizas y proteínas. Se identificó el peso molecular de una de ellas alrededor de 66

kDa, la cual ha sido parcialmente purificada. Esta proteína parece ser la más abundante del extracto.

IX.2 PERSPECTIVAS

1. Estudios *in vivo* de la fracción liofilizada (L) de la *Spirulina maxima*: es necesario la extracción de la fracción (L) a partir de la materia prima con el fin de ser probada en un modelo de hígado graso
2. Pruebas bioquímicas sobre los posibles mecanismos de acción de la *Spirulina maxima* en el desarrollo del hígado graso, tales como enzimas marcadoras de la síntesis de ácidos grasos y triacilgliceroles.
3. Estudio biodirigido de los cuatro tipos de compuestos encontrados en la fracción acetónica de *Spirulina maxima*.
4. Estudio comparativo tanto del poder antioxidante y hepatoprotector de *S. maxima* y *S. platensis* como propiedades químicas
5. Con base en la riqueza química y la actividad biológica de *Spirulina maxima*, es necesario hacer hincapié en el aspecto nutrimental. Por ejemplo el índice de mortalidad por kwasiorkor y marasmo fue disminuido en África por la ingestión de *Spirulina platensis* (47) En México, 2.6% de la población infantil muere por desnutrición, encontrándose en 7° lugar de mortalidad. Por otra parte, el 2° lugar de mortalidad (14.43%) en personas entre 35 y 54 años, es debido a enfermedades

hepáticas, donde más de la mitad de éstas mueren por alcoholismo, por lo que una alternativa para estos dos grandes problemas es el consumo de *Spirulina*.

6. Introducir en México el consumo de *Spirulina* sería un protector de daño hepático por el alto consumo de fructosa, por ejemplo en bebidas azucaradas, además, se encuentra el problema de importación de fructosa, lo cual si es grave, ya que México es el primer país productor y consumidor de refrescos, luego entonces es de esperar un mayor consumo de fructosa en estas bebidas, lo cual implica un gran daño a la salud



ANEXO I

PUBLICACIÓN ARBITRADA DE
DIFUSIÓN INTERNACIONAL.

Journal of Ethnopharmacology 64 (1999) 141–147

Journal of
ETHNO-
PHARMACOLOGY

Studies on the preventive effect of *Spirulina maxima* on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat

P.V. Torres-Durán ^a, R. Miranda-Zamora ^a, M.C. Paredes-Carbajal ^b, D. Mascher ^b,
J. Blé-Castillo ^c, J.C. Díaz-Zagoya ^a, M.A. Juárez-Oropeza ^{a*}

^a Department of Biochemistry, School of Medicine, UNAM, P.O. Box 70-159, Mexico D.F. 04510, Mexico

^b Department of Physiology, School of Medicine, UNAM, P.O. Box 70-159, Mexico D.F. 04510, Mexico

^c Central Hospital, IMSS, Villahermosa Tab., Mexico

Received 20 January 1998; received in revised form 18 June 1998; accepted 29 June 1998

Abstract

The aim of the present work was to assess if the feeding of either the oil extract of *Spirulina maxima* or of its defatted fraction would prevent fatty liver development, induced in rats by a single intraperitoneal dose of carbon tetrachloride (CCl₄). Liver and serum lipids were evaluated 4 days after treatment with this agent. Concentration of liver lipids did not differ in rats fed on a purified diet either without or with one of the fractions of *Spirulina*, except for total cholesterol, which showed a slight increase in the group receiving the oil extract of *Spirulina*. However, after CCl₄ treatment, liver total lipids and triacylglycerols were significantly lower in rats fed on a diet containing any fraction of *Spirulina* (defatted or the oil fraction) than in rats without *Spirulina* in their diet. Furthermore, the increased liver cholesterol values, induced by CCl₄ treatment, were not observed in rats receiving *Spirulina*. In addition, rats receiving whole *Spirulina* in their diet and treated only with the vehicle showed an increase in the percentage of HDL values. The changes in VLDL and LDL induced by CCl₄ treatment were not observed in the whole *Spirulina* group. Furthermore, after CCl₄ treatment the values of the liver microsomal thiobarbituric acid-reactive substances were lower in the whole *Spirulina* group than in the control group. These results support the potential hepatoprotective role of *Spirulina*. © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Spirulina maxima*; Fatty liver; Carbon tetrachloride; Triacylglycerol; Cholesterol

1. Introduction

Spirulina maxima is a cyanobacterium belonging to the Oscillatoriaceae family which grows commonly in alkaline waters (Ciferri, 1983). This

* Corresponding author. E-mail: majo@servidor.unam.mx

cyanobacterium grows naturally in Texcoco lake in Mexico and is consumed by humans, in general as a food supplement.

Toxicological studies of several *Spirulina* species have not revealed any toxic effect during and after different acute, chronic and reproductive tests (Yoshino et al., 1980; Krishnakumari et al., 1982; Chamorro et al., 1988; Chamorro and Salazar, 1990; Chamorro et al., 1996; Salazar et al., 1996).

It has been reported that *Spirulina* sp. reduce body weight in obese humans (Becker et al., 1986) as well as their total cholesterol plasma levels (Iwata et al., 1990). Furthermore, *Spirulina maxima* has been shown to decrease vascular tone of aortic rings from rats fed on a normal purified diet (Paredes-Carbajal et al., 1997) as well as preventing the development of fatty liver induced by a fructose-rich purified diet (González De Rivera et al., 1993), or by carbon tetrachloride treatment (Torres-Durán et al., 1998).

As a first attempt to elucidate the mechanisms by which *Spirulina maxima* prevents fatty liver induced by carbon tetrachloride, in this study the effects of two fractions of *Spirulina* (the oil fraction and its residual defatted fraction) on hepatic and serum lipids were evaluated. In addition, the effects of the whole *Spirulina* on the percentage of the different kinds of serum lipoproteins and the hepatic content of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) were evaluated.

2. Materials and methods

2.1 Reagents

All reagents and chemicals used were of analytical grade, except corn oil and corn starch, which were commercial products for culinary use. The rest of the diet components were from Sigma (St. Louis, MO). Glucose and organic solvents were from Merck (Mexico).

The spray-dried powder of *Spirulina maxima* (herbarium NSBC no. 12584, authenticated by C.M. González National School of Biological Sciences) used in these experiments was a gener-

ous gift from Spirulina Mexicana, S.A. de C.V. (Mexico).

The oil extract of *Spirulina* was obtained using a Soxhlet extractor and a chloroform-methanol mixture (3:1, v/v) for 24 h. Throughout the procedure special care was taken to avoid light exposure in order to preserve the *Spirulina* constituents. Removal of the solvent mixture was initiated in a vacuum rotavapor and thereafter completed by the use of a nitrogen stream at 50°C (yield, 15%). The remaining *Spirulina* (defatted) extract was dried and pulverized.

The whole or defatted *Spirulina* powder, as well as the oil extract, were mixed to homogeneity with the rest of the respective diet ingredients.

2.2 Animals and diets

In a first series of experiments, designed to identify the active substances of *Spirulina* by means of their solubility properties, 30 male Wistar rats, weighing 190–250 g (bred in the animal care and breeding unit of the School of Medicine, UNAM, Mexico City), were randomly allocated to one of three groups (groups A, D and O) of 10 rats. Each group was fed on one of the purified diets (shown in Table 1):

Group A	Control	Purified diet, without <i>Spirulina</i> extract
Group D	Experimental	Purified diet, with defatted <i>Spirulina</i> (5%) extract
Group O	Experimental	Purified diet, with an oil extract equivalent to 5% <i>Spirulina</i>

The diets were prepared according to the guidelines recommended by the American Institute of Nutrition (Bieri et al., 1977) and they were adjusted to have the same protein, carbohydrate and lipid content (Table 1). Animals were housed by lots of two or three in a room with controlled temperature (20–25°C) and light exposure (07:00–19:00 h). Water was supplied ad libitum, and the amount of diet provided was 20

Table 1
Diet composition

Ingredients* (%)	Diets			
	A (control)	D (defatted)	O (oil)	S (whole)
Casain	20.0	17.0	20.0	17.0
Corn starch	7.0	5.0	7.0	5.0
Corn oil	5.0	5.0	4.3	5.0
Cellulose	3.0	3.0	3.0	3.0
Vitamin mixture	1.0	1.0	1.0	1.0
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5
Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2
Glucose	60.0	60.0	60.0	60.0
<i>Spirulina maxima</i>				
Defatted	—	5.0	—	—
Oil extract	—	—	0.7	—
Dried whole	—	—	—	5.0

* Composition of diets A, D, O and S was adjusted to the same content of protein, carbohydrate, and oil (total lipids of *Spirulina maxima* were 15%, estimated contents of defatted *Spirulina* were 60 and 40% for protein and carbohydrate respectively)

g/day per rat. After an acclimatization period of 5 days, during which each group was fed on its respective diet, the animals were treated with a single intraperitoneal injection of either carbon tetrachloride (AC, DC and OC groups: 1.0 ml/kg body weight, diluted 1:2 with corn oil as vehicle,) or an equivalent volume of the vehicle (groups A, D and O). These latter groups were included in order to determine if diets could produce some effects on hepatic and serum lipid levels.

In a second series of experiments, designed to evaluate the effects of the whole *Spirulina* on serum lipoproteins distribution and its antioxidant properties in fatty liver, two groups of 10 rats each were fed on a purified diet with addition or not of 5% whole *Spirulina* (diets S and A, in Table 1) for 5 days, and thereafter treated with either CCl₄ (groups SC and AC) or vehicle (groups S and A).

On the fourth day after the intraperitoneal injection all animals were starved for 12 h and thereafter anesthetized with diethylether and killed by cervical dislocation. The serum was separated by blood centrifugation, and stored at -78°C. Fresh serum was used for lipoprotein analysis. Livers were excised, weighed and stored

at -78°C until lipid analyses were performed.

2.3 Preparation of the liver lipid extracts

Total lipids were extracted with chloroform-methanol (3:1, v/v) by a modified version of Folch's method. For liver samples, 1 g of tissue was homogenized in 4 vol of 0.05 M phosphate buffer, pH 7.2. Then the pH was adjusted to 6.0 by the addition of 2 N HCl solution and this suspension was extracted three times with 4 vol each of a chloroform-methanol mixture (3:1, v/v). The extract was washed with 10 ml of water, the organic fraction was evaporated under a nitrogen stream, then weighed (for total lipids), and stored at -78°C until cholesterol and triacylglycerols analyses were performed.

2.4 Analytical methods

Serum and liver concentrations of cholesterol or triacylglycerols were measured using commercial enzymatic-colorimetric kits from Lakeside, Mexico (CHOD-PAP and GPO-PAP, respectively). Total liver lipids were measured gravimetrically.

Table 2
Effects of *Spirulina* on changes induced by carbon tetrachloride on liver lipids

Treatment	Group	Total lipids (mg/g. wet weight)	Total triacylglycerols (mg/g. wet weight)	Total cholesterol (mg/g. wet weight)
Without CCl ₄	A	38.7 ± 2.6	1.30 ± 0.47	0.89 ± 0.20
	D	38.8 ± 2.2	1.03 ± 0.27	1.17 ± 0.49
	O	43.2 ± 1.9	1.19 ± 0.19	1.78 ± 0.37*
With CCl ₄	AC	50.0 ± 4.6*	2.90 ± 1.05*	1.92 ± 0.40*
	DC	36.2 ± 3.6**	0.49 ± 0.20*,**	0.49 ± 0.14* **
	OC	34.9 ± 2.5**	1.33 ± 0.10**	0.56 ± 0.08* **

Animals receiving purified diets, A (control), D (5% defatted *Spirulina*), or O (oil extract equivalent to 5% *Spirulina*) were treated with a single dose of vehicle (groups A, D and O) or carbon tetrachloride (groups AC, DC and OC). Values are expressed as mean ± S.D. of $n = 5$.

* Significantly different from corresponding value of group A; or ** significantly different from the corresponding value of group AC.

2.5 Lipoprotein analysis

Aliquots of 5 μ l from each fresh serum sample were used to estimate the percentage of the serum lipoproteins. The electrophoretic separation of lipoproteins was performed on a Ciba-Corning T-790 clinical electrophoresis unit, equipped with a densitometer. Percentage determination of each lipoprotein was performed at 520 nm.

2.6 Lipid peroxidation

This was measured by determining microsomal liver TBARS as reported by Recknagel and Ghoshal (1966).

2.7 Statistical analysis

Results were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and Duncan's test using SPSS software. A P value less than 0.05 was considered significant.

3 Results and discussion

Livers from rats of groups D or O (experimental-purified diet, with either 5% defatted *Spirulina* extract or the oil extract equivalent to 5% *Spirulina* and treated with vehicle) showed no differences in lipid concentrations relative to livers from rats of group A (Table 2), except that livers

from group O contained higher levels of total cholesterol than those of group A. Treatment with carbon tetrachloride increased the levels of total lipids, total triacylglycerols and total cholesterol only in rats from group AC. Whereas animals fed on either defatted *Spirulina* extract or on the oil extract of *Spirulina* (groups DC and OC, respectively) showed either no changes (total lipids) or even a reduction (total triacylglycerols and total cholesterol) in the concentration of liver lipids. The former results are in agreement with those from previous reports indicating that total cholesterol and triacylglycerols are increased in carbon tetrachloride-induced fatty liver (Seakins and Robinson, 1963; Torres-Durán et al., 1998).

Rats fed on a purified diet with or without one of the fractions of *Spirulina* and receiving only the vehicle (i.e. rats from group A, D or O, Table 3), showed only minor differences in serum total cholesterol levels. On the other hand, total triacylglycerols were only increased in serum from rats fed on a diet supplemented with defatted *Spirulina* (group D). These data are in line with those observed previously with whole *Spirulina* (Torres-Durán et al., 1998).

On the other hand, the increased serum levels of triacylglycerols, induced by carbon tetrachloride administration, were not modified by any fraction of *Spirulina* (groups AC, DC or OC). It is possible that changes in blood lipids would require a longer time period or a larger dose of *Spirulina* to become manifest.

Table 3
Effects of *Spirulina maxima* on changes induced by carbon tetrachloride on serum lipids

Treatment	Group	Total triacylglycerols (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)
Without CCl ₄	A	51.1 ± 9.8	68.0 ± 15.4
	D	168.8 ± 58.6*	88.0 ± 9.8
	O	60.7 ± 24.0	56.5 ± 9.4
With CCl ₄	AC	110.1 ± 40.1*	78.4 ± 13.8
	DC	77.8 ± 6.0*	73.6 ± 5.5
	OC	103.8 ± 23.9*	79.8 ± 13.6

Animals receiving purified diets. A (control), D (5% defatted *Spirulina*) or O (oil extract equivalent to 5% *Spirulina*), were treated with a single dose of vehicle (groups A, D and O) or carbon tetrachloride (groups AC, DC and OC). Values are expressed as mean ± S.D. of $n = 5$.

* Significantly different from corresponding value of group A.

It has been suggested that carbon tetrachloride administration induces an increased synthesis of fatty acids, as well as a decreased release of hepatic lipoproteins (Maling et al., 1962; Seakins and Robinson, 1963; Pencil et al., 1984; Glende and Recknagel, 1991). In preliminary experiments, the qualitative determination of lipoproteins showed that serum HDL values of rats fed on a diet containing whole *Spirulina* (group S) were higher than those observed in group A (Table 4). Furthermore, both the increase of serum VLDL and the decrease of serum LDL percentages induced by carbon tetrachloride administration (group AC) were prevented by the inclusion of whole *Spirulina maxima* in the purified diet (group SC).

So far the results of the present study show that

Table 4
Effects of *Spirulina maxima* on changes induced by carbon tetrachloride in the percentage of serum lipoproteins in the rat

Treatment	Group	HDL	LDL	VLDL
Without CCl ₄	A	34.4 ± 4.1*	12.4 ± 6.2	48.1 ± 4.1
	S	43.3 ± 5.6*	13.5 ± 0.8	43.9 ± 5.4
With CCl ₄	AC	33.8 ± 6.5	7.4 ± 1.1*	57.2 ± 7.0*
	SC	40.8 ± 7.2	13.3 ± 0.9*	45.8 ± 7.1*

Animals receiving purified diets. A (control), S (5% whole *Spirulina*) were treated with a single dose of vehicle (groups A and S) or carbon tetrachloride (groups AC and SC). Values are expressed as mean ± S.D. of $n = 5$.

* Significantly different from each other for the same kind of lipoprotein after the same treatment.

dietary *Spirulina maxima* is able to prevent the changes induced by carbon tetrachloride on liver lipids. Since the hepatotoxic effect of carbon tetrachloride is related to free radical generation (Glende and Recknagel, 1991; González Padrón et al., 1993), it is reasonable to assume that the potential hepatoprotective role of *Spirulina maxima* may be associated with its antioxidant constituents, such as selenium, chlorophyll, carotene, γ -linolenic acid, and vitamins E and C (Kay, 1991). In order to test this hypothesis, TBARS were determined in liver microsomal lipids from rats fed on the purified diet supplemented or not with whole *Spirulina maxima* (Table 5). The results of these experiments showed no differences in TBARS values between groups treated with vehicle (groups A and S). However, while carbon tetrachloride administration induced a significant

Table 5
Effect of *Spirulina maxima* on microsomal TBARS values

Treatment	Group	TBARS (μ g/g liver wet weight)
Without CCl ₄	A	12.27 ± 3.31
	S	12.05 ± 1.99
With CCl ₄	AC	14.25 ± 0.10
	SC	10.93 ± 1.41*

TBARS, thiobarbituric acid reactive substances. Animals receiving purified diets, A (control), S (5% whole *Spirulina*), were treated with a single dose of vehicle (groups A and S) or carbon tetrachloride (groups AC and SC). Values are expressed as mean ± S.D. of $n = 5$.

* Significantly different from corresponding value of group A.

increase on TBARS values in group AC, this increase was not observed in rats receiving the purified diet supplemented with whole *Spirulina* (group SC). In a previous report (Mitchell et al., 1988) it was observed that the basal levels of TBARS were lower in rats fed on a purified diet than in rats fed on a *Spirulina*-supplemented diet. Nevertheless, in that study *Spirulina* was employed as a protein source (18%) instead of casein. Since in the experiments reported herein the experimental design is different, further studies are required to confirm the above hypothesis.

4. Conclusions

The addition of defatted *Spirulina maxima* extract (5%) to the purified diet did not modify liver lipid concentrations in animals that received only the vehicle. In contrast, an increase in the liver cholesterol concentration was observed in the group fed on a diet supplemented with the oil extract of *Spirulina maxima*. On the other hand, the increase of liver triacylglycerol and cholesterol concentrations, induced by carbon tetrachloride treatment, was not only prevented but triacylglycerols and cholesterol decreased by the inclusion of any of the fractions of *Spirulina maxima* in the purified diet.

Except in group D, treated with vehicle (i.e. A vs D), no differences were observed in serum total cholesterol or triacylglycerol concentrations between groups receiving the same treatment (either with or without CCl₄).

Since the hepatoprotective effect of *Spirulina maxima* was observed with either the defatted or the oil extract, it may be assumed that both fractions contain active substances for this effect.

The fact that serum lipoprotein changes induced by carbon tetrachloride were prevented by the inclusion of whole *Spirulina maxima* in the diet suggests that either their hepatic synthesis is not affected or that its peripheral metabolism is preserved. This hypothesis would explain the lower accumulation of fatty acids in rat livers in rats receiving *Spirulina* in their diet. Furthermore, the lower liver values of lipoperoxide products found in the whole *Spirulina* group, as compared

to those without *Spirulina*, suggest an antioxidant role of the *Spirulina* constituents, and could explain the attenuation of the hepatotoxic effect of carbon tetrachloride.

Taken together, the results described above support the potential hepatoprotective role of *Spirulina maxima*.

Acknowledgements

This work was supported in part by grant IN-201296 from DGAPA-UNAM, Mexico.

References

- Becker, E.W., Jakober, B., Luft, D., Schmöling, R.M., 1986. Clinical and biochemical evaluations of the alga *Spirulina* with regard to its application in the treatment of obesity. A double-blind cross-over study. *Nutrition Reports International* 33, 565–574.
- Bicri, J.G., Stoewand, G.S., Briggs, G.M., Phillips, R.W., Woodard, J.C., Knapka, J.J., 1977. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee On Standards for Nutritional Studies. *Journal of Nutrition* 107, 1340–1348.
- Chamorro, G., Salazar, M., 1990. Estudio teratogénico de *Spirulina* en ratón. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 40, 86–94.
- Chamorro, G., Herrera, G., Salazar, M., Salazar, S., Ulloa, V., 1988. Etude de la toxicité chronique de la *Spirulina* chez le rat. *Médecine et Nutrition* 24, 104–106.
- Chamorro, G., Salazar, M., Pages, N., 1996. Lethal study of *Spirulina maxima* in male and female rats after short-term feeding. *Phytotherapy Research* 10, 28–32.
- Ciferri, O., 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiological Reviews* 47, 551–578.
- Glende, E.A. Jr., Recknagel, R.O., 1991. An indirect method demonstrating that CCl₄-dependent hepatocyte injury is linked to a rise in intracellular calcium ion concentration. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 73, 41–52.
- González De Rivera, C., Miranda-Zamora, R., Diaz-Zagoya, J.C., Juárez-Oropeza, M.A., 1993. Preventive effect of *Spirulina maxima* on the fatty liver induced by a fructose-rich diet in the rat: a preliminary report. *Life Sciences* 53, 57–61.
- González Padrón, A., de Toranzo, E.G., Castro, J.A., 1993. Late preventive effects of quinacrine on carbon tetrachloride induced liver necrosis. *Archives of Toxicology* 67, 386–391.
- Iwata, K., Inayama, I., Kato, I., 1990. Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-

- induced hyperlipidemic rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 36, 165–171.
- Kay, R.A., 1991. Microalgae as food and supplement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 30, 555–573.
- Krishnakumari, M K, Ramesh, H P, Venkataram. L., 1982. Food safety evaluation: acute oral and dermal effects of the algae *Senedesmus acutus* and *Spirulina platensis* on albino rats. *Journal of Food Protection* 44, 934–935
- Maling, H M, Frank, A, Horning, M.G., 1962. Effect of carbon tetrachloride on hepatic synthesis and release of triglycerides. *Biochimica et Biophysica Acta* 64, 540–545
- Mitchell, G.V, Jenkins, M Y, Grundel, E. 1988. Tissue α -tocopherol, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), and glutathione levels in rats fed algal proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 570 478–479
- Paredes-Carbajal, M C, Torres-Durán, P V, Díaz-Zagoya, J C, Mascher, D, Juárez-Oropeza, M A. 1997. Effects of dietary *Spirulina maxima* on endothelium dependent vasomotor responses of rat aortic rings. *Life Sciences* 61 211–219
- Pencil, S.D., Brattin, W.J Jr, Glende, F A Jr, Recknagel, R O 1984. Carbon tetrachloride-dependent inhibition of lipid secretion by isolated hepatocytes. Characterization and requirement for bioactivation. *Biochemical Pharmacology* 33 2419–2423.
- Recknagel R O, Ghoshal, A K. 1966. Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Laboratory Investigation* 15, 132–146
- Salazar, M, Chamorro, G A, Salazar, S, Steele, C E, 1996. Effect of *Spirulina maxima* consumption on reproduction and peri- and postnatal development in rats. *Food and Chemical Toxicology* 34 353–359
- Seakins, A, Robinson, D S. 1963. The effect of the administration of carbon tetrachloride on the formation of plasma lipoproteins in the rat. *Biochemistry* 86, 401–407.
- Torres-Durán, P V, Miranda-Zamora R., Paredes-Carbajal M C, Mascher, D, Díaz-Zagoya, J C, Juárez-Oropeza, M A, 1998. *Spirulina maxima* prevents induction of fatty liver by carbon tetrachloride in the rat. *Biochemistry and Molecular Biology International* 44 787–793
- Yoshino Y, Hirai, Y., Takahashi H., Yamamoto N, Yamazaki N 1980. The chronic intoxication test on *Spirulina* product fed to Wistar-strain rats. *Japanese Journal of Nutrition* 38 221–225

ANEXO II

PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS DEL EXTRACTO ACETÓNICO (C) (Diagrama 5)

Extracción con Acetona al 100%.

Se realizó con acetona al 100% y posteriormente se subfraccionó con una mezcla de hexano/benceno/metanol/agua 25:25:40:10 (v/v), obteniéndose dos extractos principales, el hexano/benceno (C1) y el metanol/agua (C2).

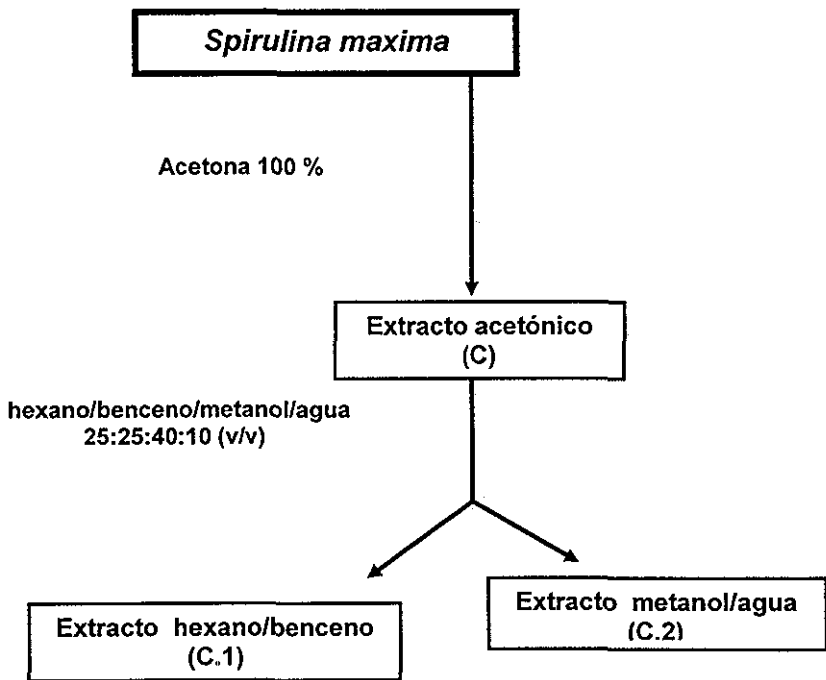
Al extracto hexano/benceno (C1), se le realizó un espectro en la región del visible 450-790 nm. El extracto crudo fue derivatizado con MeOH/H₂SO₄ (82) y se inyectaron al CG-EM para identificar ácidos grasos

Además se cromatografió en placas de sílica gel con hexano/acetona/etanol/benceno (74:23:2.5:0.5, v/v), con el fin de lograr la mejor separación en las siguientes columnas: **Columna I.** Esta columna de 80 cm de longitud por 3.5 cm de diámetro interno, fue empacada con sílica gel G60. Como fase móvil se usaron varios sistemas de disolventes, con los que se estableció un gradiente de polaridad. La muestra (292 mg del extracto hexano/benceno) se eluyó con 300 mL de hexano 100% y 100 mL de cada uno de los siguientes disolventes: hexano/benceno (8:2 y 5:5 v/v), benceno 100%, benceno/acetona (8:2 y 5:5 v/v), acetona 100%, acetona/etanol (8:2 y 5:5 v/v), etanol 100%, etanol/ácido acético (8:2 y 5:5 v/v) y ácido acético 100%. Las fracciones de elución se colectaron en 5 viales de 100 mL cada uno y 59 tubos de 20 mL. Alícuotas de cada una de las fracciones se cromatografiaron para identificar las fracciones con mayor pureza. Posteriormente, las fracciones de elución se evaporaron a sequedad bajo corriente de N₂.

Columna II. En esta columna de 12 cm de longitud por 2 cm de diámetro interno, también se utilizó sílica gel G60 como fase estacionaria. Se colocaron 28.4 mg de las 5 primeros viales obtenidos de la columna I, los cuales fueron separados con 350 mL de cada sistema

de disolventes: hexano 100 % y hexano/acetona (98:2, 95:5 y 5:5 v/v). Se obtuvo el rendimiento de las muestras puras, de las cuales se identificó el tipo de compuestos contenidos en ellas por medio de absorción de infrarrojo (IR) y por espectrometría de masas (EM).

DIAGRAMA 5
DIAGRAMA DE BLOQUES DE LA SEPARACIÓN FRACCIONADA
DE LA *Spirulina maxima*



RESULTADOS

4.2.1 Separación de la subfracción hexano/benceno (C1)

Del extracto acetónico se obtuvo un rendimiento de 8.89%, del cual se obtuvo C1 con un rendimiento de 89.5% y 7.95% de la *Spirulina* entera.

El espectro en la región del visible (450-790 nm) (Fig. 7) concuerda con los de la clorofila 'a' ya que el pico característico de ésta está a 669 nm

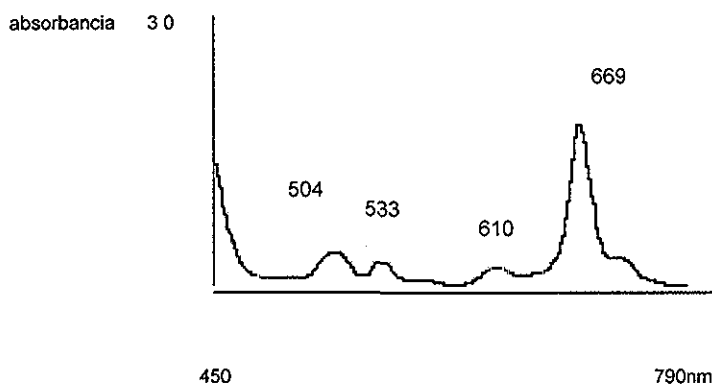


Fig. 7 Espectro de absorción de 450 a 790 nm

Se identificaron los siguientes ácidos grasos identificados: 16:0, 64.7%; 16:1, 17.2%; 18:0, 0.9%; 18:2, 7.2%; 18:3, 8.7% y 16:3, 1.3%

En la cromatografía en placas de sílica gel con el mencionado sistema de disolventes, se mostró que existen al menos 13 compuestos, lo cual ayudó a la purificación parcial de algunos compuestos con R_fs bien definidos.

Columna I. La separación, por CCF, de las fracciones de elución continua de esta columna, mostró que el extracto contiene alrededor de 30 compuestos diferentes. No obstante en las primeras 5 fracciones de elución se detectaron compuestos con mayor pureza.

Columna II. Después de separar por CCF las diferentes fracciones de elución obtenidas, se pudieron identificar cuatro fracciones con compuestos aparentemente puros. En la tabla XXIV resume los picos principales de UV-VIS y EM de los espectros de los compuestos con Rf₁, Rf₂, Rf₃ y Rf₄.

**TABLA XXIV
RESUMEN DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LOS COMPUESTOS
IDENTIFICADOS**

Compuesto *	UV-VIS		EM		CG-EM	
	λ	cromóforo	IM	PB y otros	IM	PB y otros
Rf ₁ : 0.867 (0.19%), fotosensible, amarillo	242- 310	C=C C=O	446	57 69 125 cadena alquímica, C=C	292 680	55,69 125
Rf ₂ : 0.667 (0.03%) Verde claro	294 420	C=C	663	149 fenilcetonas 43, 57 alquilos, C=C	279	149 fenilcetonas 43, 57 alquilos, C=C
Rf ₃ : 0.383 (0.14%) incolore	294	C=C	522	57, 43, 71, 85, 97, 245 C=C	---	---
Rf ₄ : 0.300 (0.14%) Incolore	297	C=C	506	57,43,71,85,97 alquilo 245,345, C=C	---	---

*Muestras sin derivatizar ** Rendimiento obtenido a partir del 100% de *Spirulina* entera
IM: ión molecular PB: pico base

Los espectros de EM₁, EM₂, EM₃ y EM₄ (correspondientes a los 4 compuestos anteriores) reflejan que proceden de compuestos impuros. Posiblemente sean una mezcla de isómeros, que por sus características de polaridad y químicas semejantes, tienen un mismo Rf.

Rf₁: 0.867.-Con base en los resultados de CG-EM y EM, probablemente el compuesto sea un hidrocarburo con dobles ligaduras de cadena larga y de alto peso molecular.

Rf₂: 0.667: El pico de 149 es típico de un ftalato, pero para que éste fuera, debería de aparecer otro en 167, el cual no se encontró. Por lo anterior, se podría sugerir que es una

mezcla de compuestos de naturaleza de fenil cetonas y con cadena alquílica y dobles ligaduras.

Rf₃: 0.383: En este Rf se encuentran compuestos alquílicos con dobles ligaduras, de alto peso molecular. Únicamente a este compuesto se le realizó IR, en el cual se obtuvieron las siguientes bandas: en 2,927 con saturaciones y metilos; en 2,854 5 alquílicos saturados; en 2,955.7 alquílicos insaturados; en 1,650 doble ligadura conjugada; en 1,150 doble ligadura terminal, en 1,210 de poca intensidad, corresponde a alquilo ramificado isopropil o terbutil, 916 6 con sobretono: vinilo y en 1701.7 y 1734 carbonilo y éster, posiblemente éster conjugado. Por tanto, el compuesto podría ser un éster de naturaleza alquílica, conjugado, con ramificaciones esterificado a otra cadena alquílica, ya que el peso molecular, 522, obtenido en EM fue muy alto.

Rf₄: 0.300: Por el tipo de espectro en EM, parecen ser compuestos de naturaleza semejante al compuesto Rf₃

DISCUSIÓN

La extracción con acetona 100% es menos fuerte que el sistema CHCl₃/MeOH y daña menos el producto. Los lípidos contenidos en este extracto (C) se encuentran el extracto CHCl₃/MeOH (O) confirmado por medio de CCF. Con la diferencia de que el porcentaje de recuperación o rendimiento, fueron diferentes.

Del extracto hexano/benceno se logró identificar una clorofila, ya que el pico característico de las clorofilas a y b está entre 642 y 680, en particular la detectada fue el pico típico de la clorofila a con un máximo de 669, el cual se comparó con un estándar puro, se ha logrado identificar en algunas cianobacterias, pero en la *Spirulina maxima* no se había identificado.

En las subsecuentes extracciones del extracto acetónico con hexano/benceno/metanol/agua se esperaba encontrar lípidos apolares en la fracción C1 y pigmentos y glicolípidos en la fracción C2, como los encontrados por Kataoka (56).

El extracto C1 dió un rendimiento de 87% del extracto cetónico, el porcentaje de ácidos grasos que contiene es muy parecido a los extractos (O) $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ y del cetónico (C) que de él proviene, además de una gran cantidad de pigmentos, ya que las columnas cromatográficas revelan la gran variedad de éstos durante la extracción. Los cromatogramas realizados después de las separaciones sucesivas mostraron cuatro manchas nítidas, como muestran sus R_f s en los cromatogramas. Con estas muestras, al ser extraídas principalmente con Hx, esperaría compuestos apolares: como la mancha con R_{f1} de 0.867, que con base al espectro UV se observan picos donde absorbe dobles ligaduras y carbonilos, el espectro de masas nos revela una mezcla de hidrocarburos de cadena larga como las ceras; éstas suelen correr casi con el frente del disolvente (Hx) (esto se observa en productos naturales fotosintéticos, 126).

El compuesto con R_f 0.667, los MS y GLC-MS mostraron picos característicos de fenilcetonas de alto peso molecular.

Los dos siguientes compuestos, con R_f 0.383 y 0.300 parecen ser el mismo tipo de compuestos, como lo reflejan los espectros de masas; estos podrían referirse a ácidos grasos esterificados a otra cadena alquílica ramificada, insaturada, de alto peso molecular.

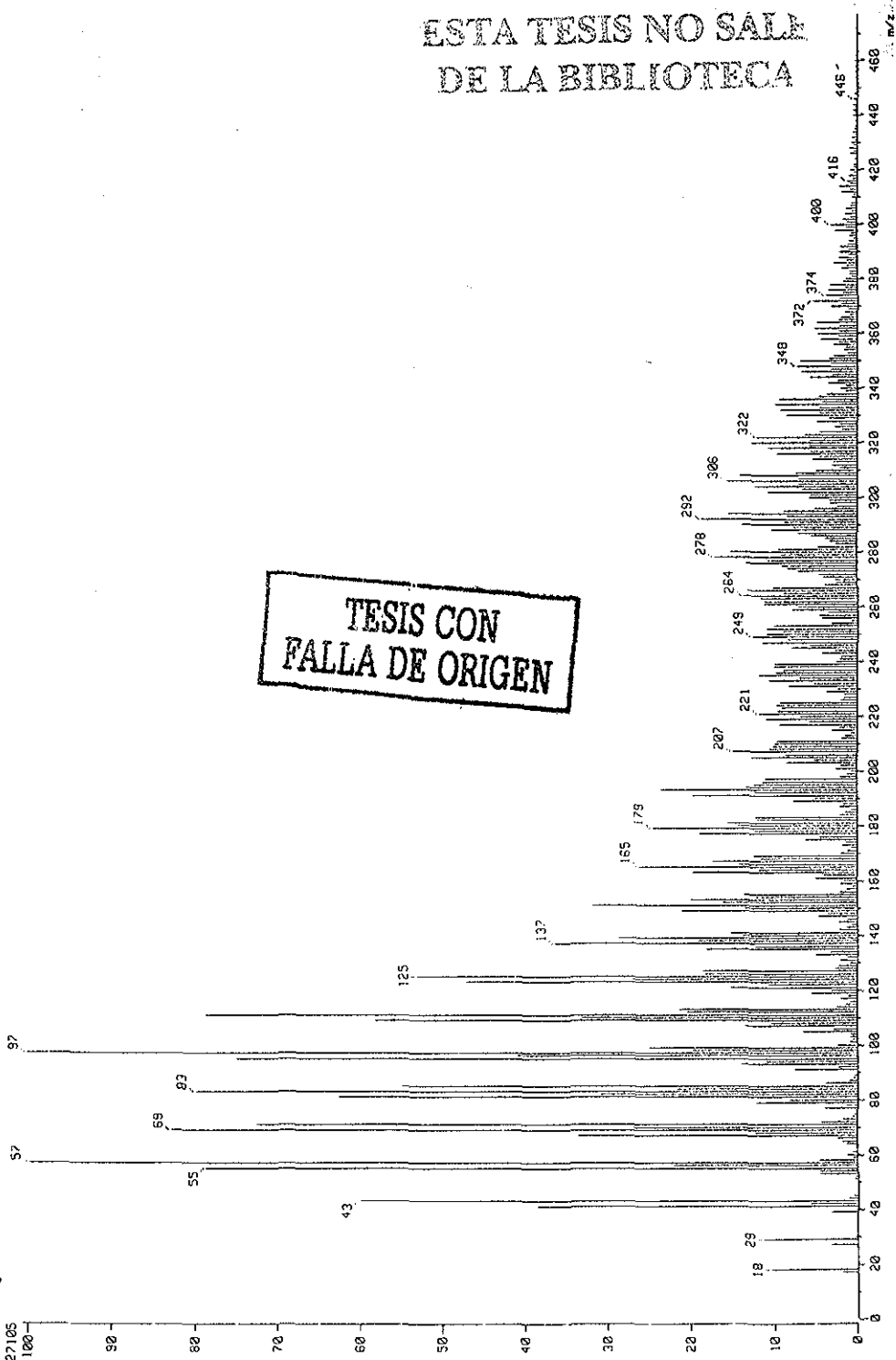
CONCLUSIONES

En el extracto Hx/Bz se identificaron ácidos grasos y la clorofila a. En este mismo extracto se aislaron 4 compuestos que tienen de característica: alquílica tal como alguna cera, el segundo ftalato o fenil cetona y los dos últimos compuestos de naturaleza alquílica, con uniones ésteres y con dobles ligaduras.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

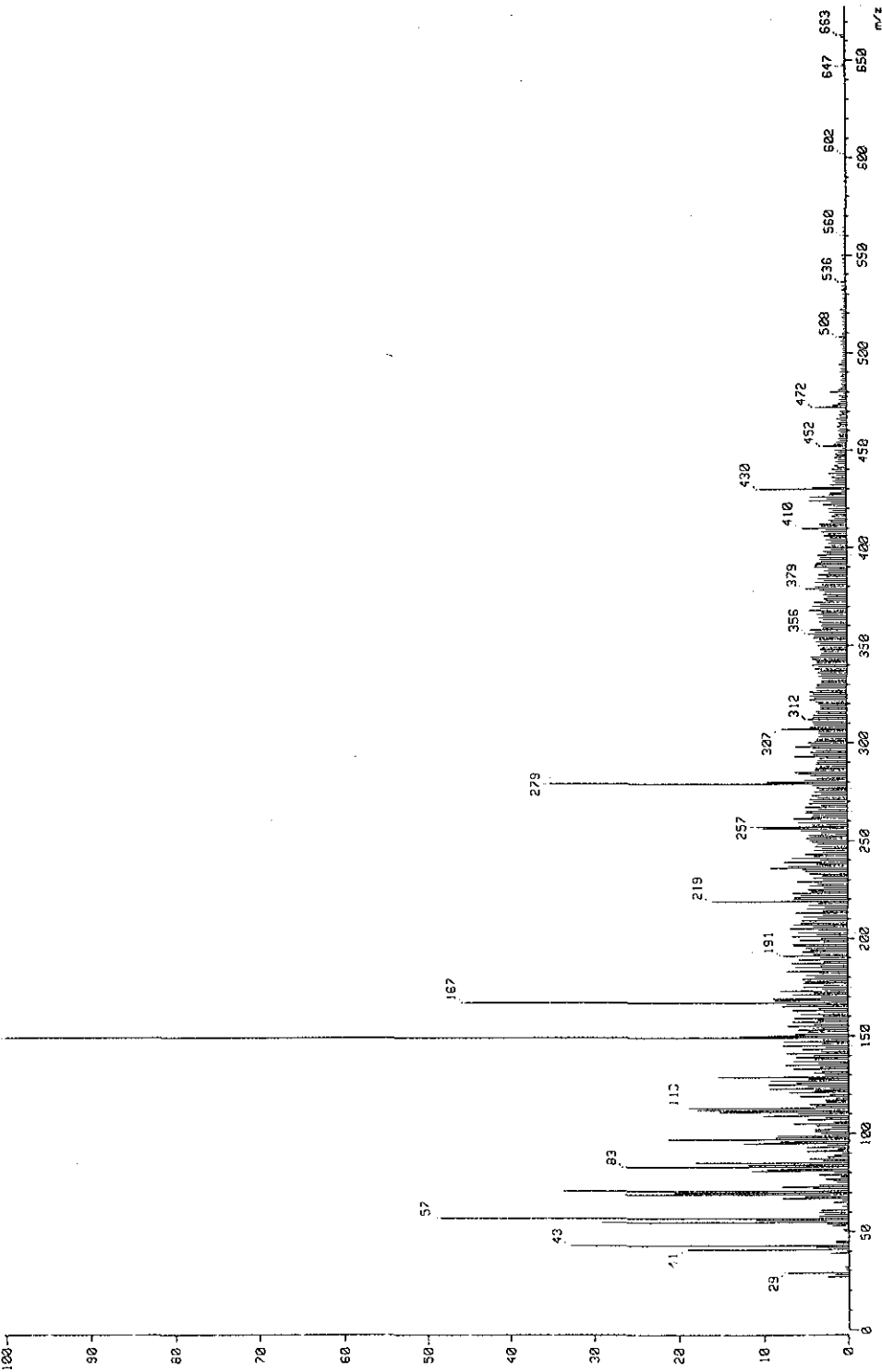
Mass Spectrum J
Data Dir-Esquivel-Baldonado-074 Date : 23-May-100 03:04
Sample: CI-6-8
Note : cera Rf 0.890
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)
RT 1.69 min Scan# : (18,96)-(16,34) Temp : 51.2 deg.C
BP : m/z 97.0200 Int. : 410.29
Output m/z range : 0.0200 to 477.1513
4327105



Mass Spectrum 1
Data: D:\Esc\level-Balchemco-077 Date: 23-May-10 03:48
Sample: 11C12
Inlet: Direct
Ion Mode: EI+

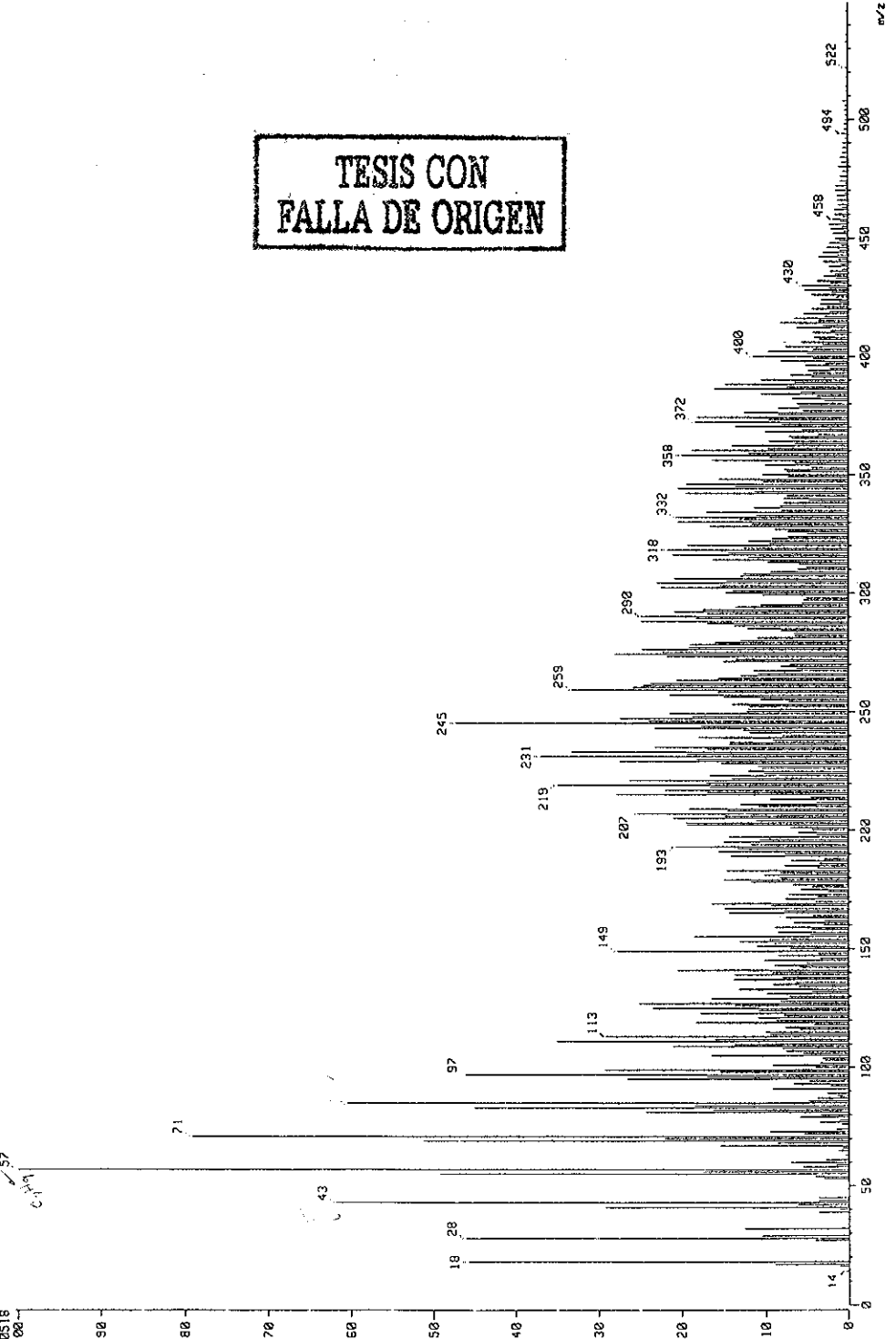
R1 0.667

Spectrum Type: Normal Ion (MF-Linear)
RT: 1.39 min Scan#: (0.85)-(3.21)
BP: m/z 149-2000 Int.: 583.68
Output m/z range: 0.0000 to 677.7448
Cut Level: 0.00 x
149



1 Mass Spectrum
 Data Dr-Esquivel-Baldomero-076 Date : 23-May-100 03:28
 Sample: GC1 226-33-~~02~~ GC1-19 **61-3** *Rf = 0.303*
 Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion (F-Linear)
 RT 1.57 min Scan# (25,81)-(14,37) Temp 113.9 deg.C
 BP : m/z 57.0200 Int. : 92.29
 Output m/z range : 0.0020 to 549.5549 Cut Level : 0.00 %
 970518
 100
 57
 6.19

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



Rt

Mass Spectrum 1
 Data Dr-Esquivel-Baldomero-075 Date : 23-May-1988 03:19
 Sample: 8C: 159G4 2.6-3.21-14
 Note : -
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion (W-Linear)
 Scan# : (17,76)-(16,39)
 RT 1.36 min Temp : 76.4 deg.C
 BP : m/z 57.0000 Int. 100.97
 Output m/z range : 0.0200 to 545.9941
 Cut Level : 0.00 %
 1065678

RT = 0.300



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- 1 Akahori A, Masui M, Ando M. Changes of serum glutamic oxaloacetic transaminase activities after the administration of carbon tetrachloride to mice *Chem Pharm. Bull* 26:2316-2320, 1977.
- 2 Alpers D, Sabesin S. Fatty liver: biochemical and clinical aspects En: DISEASE OF THE LIVER. 6th edition. Edited by Schif, León, Schiff, Eugene. J.B Lippincott, Co. Philadelphia, 1987 Cap 25. pp. 949-977
- 3 Aragón ME, Villa-Novoa I. PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS. DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, División de Ingeniería. Ed. Fac. Química, UNAM, México, D. F., 1991. pp 2-8.
- 4 Association of Official Analytical Chemist (AOAC). Determinaciones de proteína, lípidos, humedad, cenizas, fibra cruda y fibra dietética. 14 th. Ed Washington, D C 1984
- 5 Aviram M, Mocady S, Cogan U. An effective method for plasma protein separation: studies of various animal species *Comp. Biochem. Physiol.* 93B:279-282, 1989.
- 6 Barisione G, Fontana L, Cottalasso D, Domenicotti C, Pronzato MA, Nanni G. Changes in lipoglycoprotein metabolism in toxic fatty liver. *Minerva Gastroenterology Dietol.* 39:101-112, 1993.
- 7 Baron C. Étude de la décoloration des *Spirulines*. *Ann. Nutr. Alim.* 29: 615-622, 1976.
- 8 Basaga HS. Biochemical Aspects of free radicals. *Biochem. Cell Biol.* 68: 989-998, 1990.
- 9 Becker EW, Jakober B, Lluferd D, Schmulling RM. Clinical and biochemical evaluations of the alga *Spirulina* with regard to its application in the treatment of obesity. *Nutr. Rep. Int* 33: 565-574, 1992
- 10 Berry F. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 43: 506-520, 1969.
- 11 Bhakta T, Pulok K, Kakali M, Banerjee S, Subhash C, Mandal, Tapan K, Maity M, Pal BP. Evaluation of hepatoprotective activity of *Cassia fistula* leaf extract. *J. Ethnopharm.* 66:277-282, 1999.
- 12 Bhat B, Vadiraja N, Gaikwad W, Madyastha KM. Hepatoprotective effect of C-phycoyanin: Protection for CCl₄ and R-(+)-pulegone mediated hepatotoxicity in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 428-431, 1998
- 13 Bieri J, Stoewsand G, Briggs G, Knapka J, Phillips R, Woodard J. Report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* Committee on Standards for Nutritional Studies. *AIN, J. Nutr.* 107: 1340-1348, 1978.
- 14 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Bioch.* 72:248-254, 1976
- 15 Butler T. Reduction of CCl₄ *in vivo* and reduction of CCl₄ and CHCl₃ *in vitro* by tissue and tissue constituents *J Pharmacol. Exp. Ther.* 134:311-319, 1961.
- 16 Ciccolli L, Ferrali M, Casini A, Comporti FM. Effect of reduced glutathione on CCl₄ induced fatty liver. *Boll Soc Ital Biol Ser.* 57:1463-1469, 1981
- 17 Ciferri O. *Spirulina*, the edible microorganism *Microbiol. Rev.* 47:551-578, 1983.
- 18 Clement G, Durand-Chastel. L'algue *Spiruline* aliment de demain. Repport I F P No 20 743, *Institut Francais du Petrole y Sosa Texcoco, S A*, Octobre, 1982.

19. Clement G. Production and characteristic constituents of the algae *Spirulina platensis* and *maxima*. *Ann. Nutr. Aliment* 29: 477-488, 1975.
20. Cohen A, Voushak A. Fatty acid composition of *Spirulina* and *Spirulina*-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy. *Phytochemistry* 30: 205-206, 1991.
21. Connor HD, Thurman RG, Galiz MD, Mason RP. The formation of a novel free-radical metabolite from CCl₄ in the perfused rat liver and *in vivo*. *J Biol Chem* 261: 4542-4548, 1986.
22. Cunnane SC. Hepatic triacylglycerol accumulation induced by ethanol and CCl₄: interactions with essential fatty acids and prostaglandins. *Alcohol. Clin Exp. Res.* 11: 25-31, 1987.
23. Chamorro GA, Salazar S, Salazar M, Pages N. Evaluation tératologique de la *Spirulina* chez le hamster. *J. Fd. Chem. Biotechnol.* 42:188-191, 1987.
24. Chamorro GA, Herrera G, Salazar M, Salazar S, Ulloa V. Étude de la toxicité chronique de la *Spirulina* chez le rat. *Méd. Nut.* XXIV: 104-106, 1988.
25. Chamorro GA, Herrera G, Salazar M, Salazar S. Short-term toxicity study of *Spirulina* in F₃₆ generation rats. *J. Toxicol. Expér.* 8:163-167, 1988.
26. Chamorro GA, Herrera G, Salazar M, Salazar S, Ulloa V. Subchronic toxicity study in rats fed *Spirulina*. *J. Pharm. Belg* 43:29-36, 1988.
27. Chamorro GA, Salazar M. Dominant lethal assay of *Spirulina maxima* in male CD-1 mice after short-term and prolonged-term feeding. *J Food Protection* 52:125-127, 1989.
28. Chamorro GA, Salazar M. Estudio teratogénico de *Spirulina* en ratón. *Arch. Latin. Nutr.* 40:86-94, 1990.
29. Chamorro GA, Salazar M. Dominant lethal study of *Spirulina maxima* in male and female rats after short-term feeding. *Phytother. Res.* 10: 28-32. 1996.
30. Chamorro GA, Salazar M, Favila L, Bourges H. Farmacología y toxicología del alga *Spirulina*. *Rev. Invest. Clin* 48: 389-399, 1996.
31. Chamorro GA, Salazar S, Favila L, Steele Ch. Reproductive and peri and postnatal evaluation of *Spirulina maxima* in mice. *J. Appl. Phycol.* 9:107-112. 1997.
32. Chanda S, Mangipudy R, Bucci T, Mehemdale H. Stimulated hepatic tissue repair underlies heteroprotection by thioacetamide against acetaminophen-induced lethality. *Hepatology* 21: 477-486, 1995.
33. Cheesman KH, Albano EF, Tomasi A, Slater TF. Biochemical studies on the metabolic based on activation halogenated alkanes. *Environ Health Perspect* 64: 85-101, 1985.
34. Christie G, Judah JD. Mechanism of action of carbon tetrachloride on liver cells. *Proc Roy Soc London Ser. B.* 12: 214-257, 1954.
35. Dalu A, Harihara M, Mehemdale. Efficient tissue repair underlies the resiliency of postnatally developing rats to chlordecone + CCl₄. *Toxicology* 111: 29-42, 1996.
36. Di Luzio N. Antioxidants, lipid peroxidation and chemical-induced liver injury. *Fed Proc.* 32: 1875-1881, 1973.
37. Dianzani M, Muzio G, Biocca M, Canuto R. Lipid peroxidation in fatty liver induced by caffeine in rats. *Int. J. Tissue Res.* 13: 79-85, 1991.
38. Dingell J, Heimberg M. The effects of aliphatic halogenated hydrocarbons on hepatic drug metabolism. *Bioch. Pharm.* 17: 1269-1278. 1968.
39. Farrar W. Tecuitlatl: a glimpse of aztec food technology. *Nature* 211: 341-342, 1966.

40. Ferreyra EC, Bernacchi AS, San Martin MF, Castro GD, Castro JA Nicotinamide late protective effects against carbon tetrachloride-induced liver necrosis *Exp. Mol. Pathol* 60: 214-223, 1994
41. Iwata K, Inayama T, Kato T Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose induced hyperlipidemic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 36:165-171, 1990
42. Fevrier C, Seve B Incorporation of *Spirulina maxima* in swine food *Ann. Nutr. Aliment.* 29: 625-650, 1975.
43. Fiske C, Subarrow Y. Spectrophotometric ultramicrodetermination of inorganic phosphorus, lipid phosphorus serum. *J. Biol. Chem.* 66: 375-376, 1925
44. Fisher S. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid *Adv. Lipid Res.* 23:169, 1989
45. Folch J, Lees M, Stanley S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues *J. Biol. Chem.* 497-509, 1956.
46. Franke H, Springer M, Pulz O, Tietz U, Muller U Polyunsaturated fatty acids from microalgae. *Food Ingredients* 4:41-45, 1994
47. Fox D. Health benefits of *Spirulina* and proposal for a nutrition test on children suffering from kwashiorkor and marasmus. *Bulletin de l'Institut océanographique, Monaco, No. especial 12, 1993.*
48. Gergely J, Kulcsar A, Harstlvi J Changes in fat metabolism in acute CCl₄ intoxication of rats. *Acta Pharm. Hung* 65: 3-4, 1995.
49. Ghoshal A, Recknagel R. Positive evidence of acceleration of lipoperoxidation in rat liver by CCl₄, *in vitro* *Life Sci* 4:1521-1530, 1965
50. Gitler C, Zarmi B, Kalef E. General method to identify and enrich vicinal thiol proteins presents in intact cells in the oxidized, disulfide state. *Anal. Biochem.* 252: 48-55, 1997.
51. González de Rivera C, Miranda-Zamora R, Díaz-Zagoya JC, Juárez-Oropeza MA Preventive effect of *Spirulina maxima* on the fatty liver induced by a fructose-rich diet in the rat, a preliminary report. *Life Sci.* 53: 57-61, 1993.
52. Gravela E, Albano E, Dianzani MU, Poli G, Slater TF Effects of carbon tetrachloride on isolated rat hepatocytes: inhibition of protein and lipoprotein secretion. *J. Biochem* 178: 509-512, 1979
53. Guérin-Dumartrait E, Moysse A. Caractéristiques biologiques des *Spirulines*. *Ann. Nutr. Alim* 30: 439-496, 1976
54. Jung-Bum L, Hayashi T, Hayashi K, Sankawa U, Maeda M, Nemoto T, Nakanishi H Further purification and structural analysis of Calcium Spirulan from *Spirulina platensis*. *J. Nat. Prod* 61: 1101-1104, 1998.
55. Hedrick J, Smith A. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis *Arch. Bioch. Biophys.* 126: 155-164, 1968
56. Hudson BJ, Karis IG. The lipids of the alga *Spirulina* *J. Sci. Food Agr.* 25: 759-763, 1987
57. Jafri MA, Sjubhani JM, Javed K, Singh S. Hepatoprotective activity of leaves of *Cassia occidentalis* against paracetamol and ethyl alcohol intoxication in rats. *J. Ethnopharm.* 66: 355-361. 1999
58. Janbaz K, Gilani A Evaluation of the protective potential of *Artemisia maritima*, extraction no acetaminophen and CCl₄ induced liver damage. *J. Ethnopharm.* 47: 43-47, 1995
59. Joly JG, Villeneuve J, Mavier P, Héту C. Mechanism of induction by ethanol of hepatic

- microsomal drug metabolizing enzymes. *Biochem. Pharm* 24: 101-107, 1975.
60. Judah JD, McLean AEM, McLean EK. Biochemical mechanisms of liver injury. *Am. J. Med.* 46: 609-616, 1970
 61. Kim H. Carotenoids protect cultured rat hepatocytes from injury caused by CCl₄. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 27(12):1303-1309, 1995.
 62. Kataoka N, Misaki A. Glycolipids isolated from *Spirulina maxima*: Structure and fatty acid composition. *Agr. Biol. Chem* 47: 2349-2355, 1983.
 63. Kay AR. Microalgae as food and supplement. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30: 555-573, 1991.
 64. Kolman A. Radioprotective effect of extract from *Spirulina platensis* in mouse bone marrow cells studied by using the micronucleus test. *Toxicology Letters* 48: 165-169, 1989.
 65. Kumaravelu P, Dakshinamoorthy D, Subramaniam S, Devaraj J, Devaraj N. Effect of eugenol on drug metabolizing enzymes of carbon tetrachloride-intoxicated rat liver. *J. Biochem. Pharm.* 49: 1703-1707, 1995
 66. Lieber C. Effects of ethanol upon lipid metabolism. *Lipids* 9: 103-116, 1973.
 67. Lieber C. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 Update. *Alcoh. Clin. Exp. Res.* 15: 578-592, 1991.
 68. Mc Gregor D, Lang M. Carbon tetrachloride: Genetic effects and other modes of action. *Mutation Res* 366:181-195, 1996
 69. Martínez NN. Sterols of *Spirulina maxima*. *Phytochem* 10: 2537-2538, 1971
 70. Materassi RH, Paoletti C, Balloni W, Florenzano G. Some considerations on the production of lipid substances by microalgae and cyanobacteria. En: ALGAE BIOMASS, Shelef G, Soeder CJ Eds, Elsevier/North-Holand Biomedical Press, New York, 1980 pp 619
 71. Mathew B, Sankaranarayanan R, Nair P, Verghese Ch, Somanathan T, Amma P, Amma NS, Fair MK. Evaluation of chemoprevention of oral cancer with *Spirulina fusiformis*. *Nutr. Can* 24:187-202, 1995.
 72. Mehendale HM. Potentiation of halomethane toxicity by chlordecone: a hypothesis for the mechanism. *Med. Hypot.* 33: 289-299, 1990
 73. Mehendale HM. Mechanism of the interactive of halomethane hepatotoxicity and lethality by other chemicals. En: TOXICOLOGY OF CHEMICAL MIXTURES. Ed. RSH Yang, 1995 pp 299-334
 74. Mendel F. Improvement in the safety of foods by SH containing aminoacids and peptides. *J. Agr. Food Chem.* 42: 3-20, 1994.
 75. Miranda MS, Cintra RG, Barros BM, Jancini-Fiho. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz. J. Med. Biol. Res* 31: 1075-1079, 1998
 76. Mitchell GV, Grundel E, Jenkins M, Blakely SR. Effects of graded dietary levels of *Spirulina maxima* on vitamins A and E in male rats. *J. Nutr.* 120: 1235-1240, 1990
 77. Molina-Piñero V, Sánchez-Medal L. Patología y Bioquímica del alcoholismo. En: EL ALCOHOLISMO EN MÉXICO. Fundación de Investigaciones Sociales, A. C. Impresiones Modernas, 2a. Edición, México, D. F., 1985, pp 49-73 y 83-106.
 78. Nakaya MD, Yasuhiko Homma MD, Yuichiro G. Cholesterol lowering effect of *Spirulina*. *Nutr. Rep. Int.* 37: 1329-1337, 1988

- 79 Paredes-Carbajal MC, Torres-Durán PV, Díaz-Zagoya JC, Mascher D, Juárez-Oropeza MA. Effects of dietary *Spirulina maxima* on endothelium dependent vasomotor responses of rat aortic rings. *Life Sci*. 61: 211-219, 1997.
- 80 Paredes-Carbajal MC, Torres-Durán PV, Rivas-Arancibia S, Zamora-González J, Mascher D, Juárez-Oropeza MA. Effects of dietary *Spirulina maxima* on vasomotor responses of aorta rings from rats fed on fructose-rich diet. *Nutr. Res* 18: 1769-1782, 1998
81. Paredes-Carbajal MC, Torres-Durán PV, Díaz-Zagoya JC, Mascher D, Juárez-Oropeza MA. Effects of the ethanolic extract of *Spirulina maxima* on endothelium dependent vasomotor responses of rat aortic rings. *J. Ethnopharm.* 75: 37-44, 2001.
- 82 Pesh-Imam, Recknagel R. Lipid peroxidation and the concept of antioxygenic: Vitamin E, changes in acute experimental CCl₄, BrCCl₃ and ethanol induced liver injury. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 42: 463-475, 1977
- 83 Plaa GL. Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 43-65, 2000.
84. Plaa GL. Free Radical-mediated liver injury. En: FREE RADICAL TOXICOLOGY. Ed. Taylor and Francis, Washington DC, 1997. pp.175-184.
85. Poli G, Gravela E, Albano E, Dianzani MU. Studies on fatty liver with isolated hepatocytes. II. The action of CCl₄ on lipid peroxidation, protein and triglyceride synthesis and secretion. *Exp. Mol. Pathol.* 30: 116-1127, 1979
86. Poli G, Chiarpotto E, Biasi F, Albano E, Carini R, Marianari UM, Dianzani MU. Lipid peroxidation and haloalkylation in CCl₄-induced fatty liver degeneration and necrosis. *Basic Life Sci.* 49: 807-810, 1988
87. Poon MK, Ip SP. Effect of *Schisandrin B* on hepatic glutathione antioxidant system in mice: protection against carbon tetrachloride toxicity. *Planta Med* 61 398-401, 1995
88. Qureshi MA, Ali RA. *Spirulina platensis* exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. *Immunopharm. Immunotoxicology* 18:457-463, 1996.
89. Radwan SS. Degradation and Derivatition, Cap. 14. En CRC SERIES IN CHROMATOGRAPHY HANDBOOK OF CHROMATOGRAPHY: LIPIDS. Helmut K, Mongolod D. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida, 1986 pp 512
90. Recknagel R. Studies of biochemical changes in subcellular particles of rat liver and their relation to a new hypothesis regarding pathogenesis of CCl₄ fat accumulation. *J Biol. Chem* 236: 564, 1961.
91. Recknagel R. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharm. Rev* 19: 145-208, 1967.
92. Recknagel R, Ghoshal A. Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Lab. Invest.* 15: 132-147, 1966.
93. Recknagel R, Ghoshal AK. New data on the question of lipoperoxidation in carbon tetrachloride poisoning. *Exp. Mol. Pathol* 5: 108-117, 1966
94. Recknagel R, Ghoshal AK. Quantitative estimation of peroxidative degeneration of rat liver microsomal and mitochondrial lipids after carbon tetrachloride poisoning. *Exp. Mol. Pathol* 5: 413-426, 1966
95. Recknagel RO, Glende EA Jr. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit. Rev. Toxicol* 2: 263-97, 1973.

96. Rendon JL, Calcagno M, Mendoza-Hernández G, Ondarza R. Purification, properties, and oligomeric structure of glutathione reductase from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Arch. Biochem. Biophys.* 248: 215-223, 1986.
97. Reynolds E. Comparison of early injury to liver endoplasmic reticulum by halo-methanes, hexachloroethane, benzene, toluene, bromobenzene, ethionine, thioacetamide and dimethylnitrosamine. *Biochem Pharm.* 21: 2555-2561, 1972
98. Rippka R, Herdman M. Catalogue and taxonomic handbook. Vol. I. Institut Pasteur, 1993. Paris.
99. Rojas C, Cadenas S, Pérez-Campo R, López-Torres M. Relation between lipid peroxidation, fatty acid composition in the liver during carbohydrate and caloric restriction in mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 306: 59-64, 1993
100. Romano I, Bellitti MR, Nicolaus B, Lama L, Manca MC, Pagnotta E, Gambacorta A. Lipid profile: a useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacteria in *Spirulina* genus. *Phytochemistry* 54: 289-294, 2000.
101. Rudman D. Desnutrición protéico-calórica. En: PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA. Editado por Harrison. Ed. Interamericana, McGraw-Hill. 7a. Ed, México, D. F., 1988. Cap 72, pp.488-489.
102. Salazar M, Chamorro GA. Étude de la dominance létale de *Spirulina maxima* chez le rat mâle. *Sciences des Aliments* 10: 713-718, 1990
103. Salazar M, Chamorro GA. Study of lethal dominant of *Spirulina maxima* in male rats. *Sci. Alim.* 10:713-718, 1990
104. Salazar M, Chamorro GA, Salazar S, Steele CE. Effect of *Spirulina maxima* consumption on reproduction and peri and postnatal development in rats. *Food Chem. Toxicol.* 34: 353-359. 1996.
105. Salazar M, Martínez, E, Madrigal E, Ruiz E, Chamorro GA. Subchronic toxicity study in mice fed *Spirulina maxima*. *J. Ethnopharmacol*, 1998
106. Santillán C. Mass production *Spirulina*. *Experientia* 38: 40-43, 1982
107. Sautier C, Trémolieres. Valeur alimentaire des algues *Spirulines* chez l'homme. *Ann Nutr. Alim.* 30: 517-534, 1976
108. Seawright AA, Mc Lean EM. The effect of diet on carbon tetrachloride metabolism. *Biochem J.* 105: 1055-1060, 1967.
109. Shinichi T, Shimada K. Characterization of carotenoids in photosynthetic bacteria. *Methods in Enzymology* 213: 374-390. 1992.
110. Shin-Yung S. Spectrophotometric ultramicrodetermination of inorganic phosphorus and lipid phosphorus in serum. *Anal. Chem.* 34: 1164-1166, 1962
111. Shizuo-Toda, Shirataki Y. Inhibitory effects of *Astragali radix*, a crude drug in oriental medicines, on lipid peroxidation and protein oxidative modification by copper. *J. Ethnopharm.* 68: 331-333, 1999.
112. Swartz J, Sklar G. Regression of experimental hamster cancer by beta carotene and algae extracts. *J Oral Maxillo. Surg.* 45: 510-515, 1987
113. Swartz J, Sklar G, Reid S, Trickler D. Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina-Dunaliella* algae. *Nutr. Cancer* 11: 127-134, 1988.
114. Torres-Durán P.V, Miranda-Zamora R, Paredes-Carbajal MC, Mascher D, Díaz-Zagoya JC, Juárez-Oropeza MA. *Spirulina maxima* prevents induction of fatty liver by carbon tetrachloride

- in the rat *Biochem Mol Biol Int* 44(4) 787-793, 1998.
115. Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza MA. Efecto *in vivo* de la *Spirulina maxima* sobre el hígado graso de rata. Reunión Anual de Estudiantes de Investigación Biomédica y de la Salud, 1996, (exposición oral y cartel)
 116. Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza MA. Efecto *in vivo* de la *Spirulina maxima* sobre los niveles de lípidos sanguíneos y hepáticos en hígado graso de rata. XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Zacatecas, Zac. Noviembre, 1994 #248.
 117. Torrielli M, Ludovica G, Dianzani U. Ethanol-induced hepatotoxicity: experimental observations on the role of lipid peroxidation. *J. Pathol.* 126: 11-25, 1978.
 118. Tropis M, Bardou F, Bersch B, Daffé M, Milon A. Composition and phase behavior of polar lipids isolated from *Spirulina maxima* cells grown in a perdeuterated medium. *Biochim. Biophys Acta* 1284: 196-202, 1996.
 119. Tsukamoto H, Towner S, Ciofalo L, French S. Ethanol-Induced liver fibrosis in rats fed high fat diet. *Hepatology* 6: 814-822, 1986
 120. Tulliez JG, Borjes C, Boudéne C, Février. Les hydrocarbures des algues Spirulines: nature, étude du devenir de l'heptadécane chez le rat et le porc. *Ann. Nutr. Alim* 563-572, 1975.
 121. Vadiraja B, Gaikwad N, Madyastha M. Hepatoprotective effect of C-phycoerythrin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pugelone mediated hepatotoxicity in rats. *Biochem Biophys Res. Comm* 249:428-431. 1998.
 122. Van S, Lanckmans S. Liver disturbances in obesity and diabetes mellitus. *Int J. Obesity* 19, Suppl 3: S27-S36, 1995
 123. Viti C, Ventura S, Lotti F, Capolino E, Tomaselli L, Giovannetti L. Genotypic diversity and typing of cyanobacterial strains of the genus *Arthrospira* by very sensitive total DNA restriction profile analysis. *Res. Microbiol.* 148: 605-611, 1997
 124. Vynamon HA, Isenberg NJ, Nguyen CH. Erythrocyte malondialdehyde release in vitro: a functional measure of vitamin E status. *Clin Chim. Acta* 151: 169-176, 1985.
 125. Wang-Guang Ce, Zhou BC, Tseng, K. Spectroscopic properties of the C-phycoerythrin-allophycocyanin conjugate and the isolated phycobilisomes from *Spirulina platensis*. *Photosynthetica* 34 (1) 57-65, 1997.
 126. WHO-UNICEF, World Health Organization, Nutrition Department. En "SPIRULINA ALGAE OF LIFE", Institute of Oceanography Bulletin No 12, April 1998.
 127. Wilson ER Jr, Williams WL. Responses of fatty liver of mice on carbon tetrachloride. *Anal. Res.* 165: 391-399. 1969
 128. Wirtshafter Z, Cronyn M. Free radical mechanism for solvent toxicity. *Arch. Environ. Health.* 9: 186-191, 1964.
 129. Yang HN, Lee EH, Kim HM. *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. *Life Sciences* 61:1237-1244, 1997
 130. Yaping L, Hartley DP, Liu J. Protection against carbon tetrachloride hepatotoxicity by oleanolic acid is not mediated through metallothionein. *Toxicol. Lett.* 95: 77-85, 1998.
 131. Yasuhara M, Ohama T, Matsuki N, Saito H, Shiga J, Inoue K, Kurokawa K, Teramoto T. Induction of fatty liver by fasting in suncus. *J. Lipid Res.* 32: 887-891, 1991.
 132. Yuan H, Zeng Z. The determination of sterols in three species of *Spirulina* by using GLC/MS. *Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing* 1: 57-6. 1992.

133. Zafaralla-Marina T, Barril-Carlito R, Vidal-Lina R, Serana-Milagros, Aguila L, Tansesin LG. Protein from *Spirulina*. *J. Technol.* 10:18-26, 1985.
134. Zhang C. The effects of a polysaccharide and phycocyanin from *Spirulina platensis* variety on peripheral blood and hematopoietic system of bone marrow in mice. Second Asia-Pacific Conference on Alga Biotechnology, April 1994.
135. <http://www.ssa.gob.mx>
136. <http://www.earthrise.com/ERLibNews98.html>