

PERSPECTIVA DE UTILIZARE A GLICINATULUI DE Cr(III) PENTRU OBȚINEREA BIOMASEI DE SPIRULINĂ ÎMBOGĂȚITE CU CROM – SURSĂ DE PRODUSE ANTIDIABETICE

*Valentina BULIMAGA, Liliana ZOSIM, Daniela ELENCIUC**

Universitatea de Stat din Moldova

**Universitatea Academiei de Științe a Moldovei*

A fost studiată influența glicinatului de crom și a regimului de iluminare asupra productivității spirulinei și acumulării cromului în biomasă. S-a stabilit că compusul coordinativ $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$ în limitele de concentrații 5-30 mg/l manifestă un efect stimulator asupra productivității spirulinei cultivate în regim de iluminare continuă și în cel cu fotoperioada zi/noapte 14/10 ore, asigurând obținerea biomasei cu un conținut înalt de crom.

Cuvinte-cheie: *Spirulina platensis, biomasă îmbogățită cu crom, glicinat de crom, bioacumulare.*

Cr(III) GLYCINATE USING PROSPECT FOR OBTAINING OF CHROMIUM ENRICHED SPIRULINA BIOMASS - SOURCE OF ANTIDIABETIC PRODUCTS

The effects of chromium glycinate and lighting regime on spirulina productivity and chromium accumulation in biomass were studied. The stimulatory effect of coordination compound $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$ (5-30 mg/l) on productivity of spirulina, grown in both lighting regime: continuous and with photoperiod 14/10 hours, as well as chromium accumulation in biomass were established.

Keywords: *Spirulina platensis, chromium rich biomass, chromium glycinate, bioaccumulation.*

Introducere

În pofida unor informații controversate privind efectele cromului asupra organismului uman și animal, a devenit răspândită pe larg utilizarea suplimentelor nutritive cu crom pentru scăderea masei corporale la obezi, dezvoltarea masei musculare la sportivi și în tratarea bolnavilor de diabet de tip 2. Formele chimice ale Cr(III) dintre cele mai frecvent utilizate în suplimentele alimentare sunt Cr(III) tris-picolinatul (CrPic) și Cr(III) nicotinatul (CrNic).

În ultimele decenii picolinatul de Cr(III) este utilizat ca supliment nutritiv pentru pierderea în greutate și creșterea masei musculare; în plus, acesta a demonstrat și o capacitate eficientă de a atenua simptomele de diabet de tip 2. Pe de altă parte, ca bioaditiv CrPic are și unele dezavantaje. El are o solubilitate foarte limitată în apă (0,6 mM, la pH cca 7) și o stabilitate joasă (în medii acide, la diminuarea valorii pH complexul hidrolizează pentru a elibera acidul picolinic) – factor determinant în rata scăzută de absorbție gastrointestinală – 1% [20].

Rezultatele cercetărilor privind efectele toxice produse de CrPic au fost revizuite în unele publicații recente, afirmațiile descrise purtând totuși caractere contradictorii [18,21]. Astfel, conform lui Wani, acest compus provoacă necroza tubulară acută la șobolani (masculi) [21]. Stout și al. au efectuat studii privind toxicitatea și carcinogenitatea acestui compus (sub formă de monohidrat) la șobolani F344/N și șoareci B6C3F1 (masculi și femele), fiind suplimentat în hrana pentru animale în concentrații de 0, 2.000, 10.000, 50.000 ppm timp de 2 ani [18]. Expunerea la CrPic nu induce modificări biologice semnificative în supraviețuire, în masa corporală, în consumul de hrană și n-au fost observate leziuni non-neoplazice la șobolani sau șoareci.

A fost evaluată și toxicitatea orală acută a complexului trinuclear al glicinatului de crom (III) – $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+\text{NO}_3^-$ și s-a stabilit că în doza de 2000 mg/kg la șobolani acest compus nu cauzează schimbări patologice în țesuturile de ficat și rinichi și poate fi atribuit la categoria 5 în sistemul GHS sau la clasa a 4-a în sistemul de clasificare din UE [17].

Pentru excluderea unor efecte adverse ale compușilor Cr(III) asupra organismului uman, este de perspectivă utilizarea suplimentelor naturale cu conținut de crom, cum ar fi drojdiile îmbogățite cu crom [11] sau spirulina cu conținut înalt de crom [3,6,7,14,22] și alte substanțe bioactive [14,16].

Cercetările noastre anterioare privind utilizarea unor compuși coordinativi ai Fe(III) la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* au demonstrat că compușii trinucleari oxo-centrați ai Fe(III) cu aminoacizii au o biodisponibilitate mai sporită, comparativ cu compușii anorganici ai Fe(III) și asigură o acumulare înaltă a

fierului în biomasă [14]. Se poate presupune că și complexele Cr(III) cu aminoacizii, care au o solubilitate înaltă, pot fi utilizați la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis*, ceea ce ar asigura obținerea biomasei cu un conținut bogat de crom legat în compușii organici din componența spirulinei. În acest scop am sintetizat un nou complex al Cr(III) cu glicina – $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$.

Material și metode

Sinteza glicinatului de crom solubil în soluții alcoolice și apă a fost efectuată conform metodei elaborate de Abdel-Monem și Anderson [1]. La 0,075 moli $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (18,989 g) se adaugă 135 ml H_2O și apoi 0,225 moli glicină (16,875 g) și se încălzește la 90°C timp de 30 min., agitând soluția până culoarea verde trece în albastră-verde-întunecat. Se răcește soluția până la 30°C și se adaugă cu picătura soluție de 2N NaOH până la apariția culorii dark purple (violetă-întunecat). Se evaporă soluția până devine siropoasă. Se adaugă alcool de 48% (în alcool de 96% nu se dizolvă). În cazul formării precipitatului de NaCl, acesta se înlătură prin filtrare. Spectrul UV-VIS al glicinatului de crom în soluție alcoolică (0,01 ml în 2,5 ml alcool de 48%) a demonstrat un maximum la 225 nm. Masa moleculară a $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^+\text{Cl}^-$ este egală cu 309,5 g/mol.

Metoda de determinare a cromului cu difenilcarbazona. La 20 mg biomasă se adaugă 0,3 ml HClO_4 concentrat și 0,15 ml HNO_3 și se efectuează mineralizarea la temperatura de $160-180^\circ\text{C}$ până la decolorarea completă a soluției. La probă se adaugă 0,5 ml H_2O , 0,2 ml 10N NaOH (verificăm ca valoarea pH să fie bazică), 0,01 ml H_2O_2 de 30% și se fierbe până la siccitate. La rest se adaugă 0,2 ml H_2SO_4 de 20%, 2 ml H_2O și 0,2 ml difenilcarbazonă de 0,1% în alcool etilic de 96%. După 10 min. se măsoară E la 540 nm. Conținutul de crom se calculează din curba standard, folosind ca etalon soluția de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ în concentrații de 1-5 mcg/probă.

Regimul de cultivare a spirulinei în prezența $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^+\text{Cl}^-$. Cultivarea spirulinei s-a efectuat timp de 10 zile în două regimuri de iluminare: fotoperioda noapte/zi (10/14 ore) și iluminare continuă (2000 lx). Glicinatul de crom a fost suplimentat în concentrațiile: 1, 5, 10, 20, 30, 40, 45 mg/l în 3 variante: în prima zi de cultivare, în a 3-a zi de cultivare, în rate (porționat în prima zi și în a 3-a zi). Biomasă cultivată în decurs de 10 zile a fost separată de lichidul cultural, spălată cu apă bidistilată și suspendată într-un volum determinat de apă cu concentrația finală de 10 mg/ml.

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetărilor privind productivitatea și conținutul de crom în biomasă sunt prezentate în figurile 1 și 2. Productivitatea spirulinei atestă valori mai înalte la cultivare în regim de iluminare continuă, înregistrând valori maxime de 1,3-1,4 g/l în limitele de concentrații 20-30 mg/l, indiferent de regimul de suplimentare a compusului (Fig.1). La cultivare în decurs de 10 zile, în regim de iluminare zi/noapte (14/10 ore), productivitatea atinge valori moderate și depinde de modul de suplimentare a $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$, atingând valori maxime de 1,0 și 1,1 g/l la suplimentarea compusului porționat în concentrații de 30 și 40 mg/l (Fig.1).

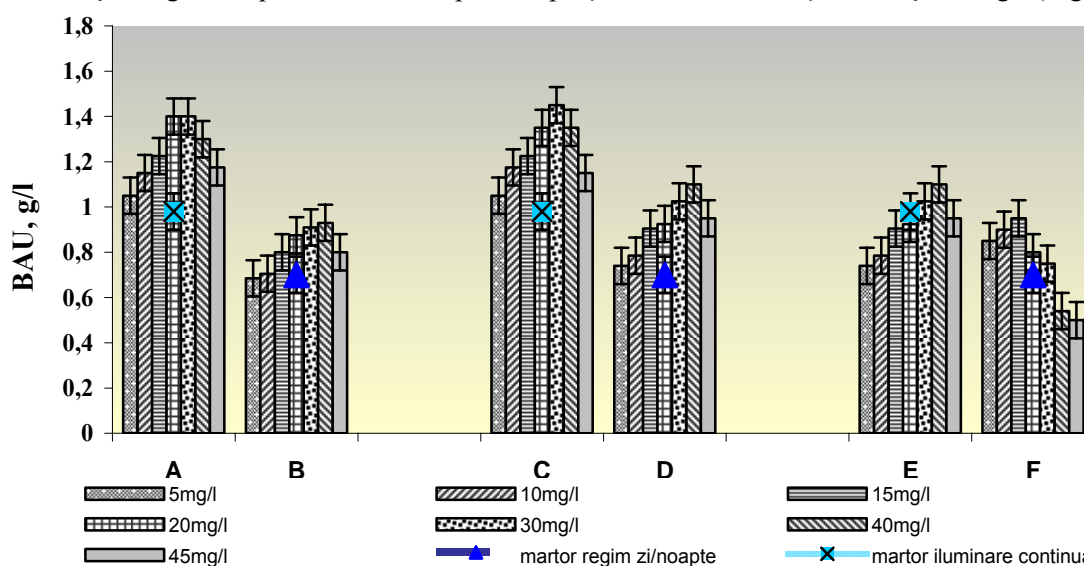


Fig.1. Productivitatea spirulinei la suplimentarea glicinatului de crom în mediul de cultivare în prima zi de cultivare (A, B), porționat (în prima și a 3-a zi) (C, D) și în a treia zi de cultivare (E, F) la iluminare continuă (A, C, E) și în regim de iluminare zi/noapte (B, D, F).

Putem concluziona că compusul coordonativ $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$ în toate cazurile studiate, cu excepția suplimentării lui în ziua a 3-a de cultivare, are un efect stimulator asupra productivității spirulinei, ceea ce confirmă toxicitatea mai redusă a compușilor coordonativi ai Cr(III), comparativ cu sărurile anorganice ale Cr(III) [15].

La ambele regimuri de iluminare prezența $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$ are un efect pozitiv asupra acumulării biomasei și se atestă valori esențial mai înalte față de proba de referință, cu excepția suplimentării compusului în a 3-a zi de cultivare, în concentrații de 20-45 mg/l. De menționat, că la cultivare în regim zi/noapte cu sau fără suplimentarea glicinatului de crom productivitatea atestă valori esențial mai diminuate față de cele înregistrate în cazul cultivării spirulinei în regim de iluminare continuă. Posibil că diminuarea productivității în regim de iluminare zi/noapte se datorează temperaturii mai scăzute noaptea (25°C) în lipsa iluminării, comparativ cu temperatura optimă (35°C) din cursul zilei și sub acțiunea sursei de iluminare. Acest fapt este confirmat și de datele altor autori, care au stabilit că rata de acumulare a biomasei la spirulina cultivată la 25°C noaptea a fost mai mică (în medie cu 7,6% din substanța uscată), comparativ cu cultura cultivată la 35°C [19]. Procesul s-a dovedit a fi dependent de temperatură și de intensitatea luminii, la care celulele au fost cultivate, deoarece factorii menționați influențează asupra acumulării biomasei. A fost observată o creștere a sintezei de carbohidrați, atunci când celulele au fost cultivate la o iluminare sporită sau la temperatura de 25°C. O parte de glucide sintetizate în timpul zilei era parțial utilizată pentru sinteza proteinelor noaptea [19]. În ce privește acțiunea cromului asupra proceselor fiziologo-biochimice la unele specii de plante, au fost bine studiate anterior efectele lui fitotoxice asupra creșterii plantelor, cum ar fi mușchii, orezul, mazărea, grâul etc. Atât Cr(III), cât și Cr(VI) pot reduce conținutul de clorofilă și, prin urmare, inhibă creșterea [13,15]. Diminuarea conținutului de clorofilă și carotenoizi în prezența metalelor grele a fost observată și la *Spirulina sp.* [2].

Rezultatele obținute privind conținutul de crom în biomasă demonstrează că la suplimentarea glicinatului de crom în prima zi de cultivare și în rate (porționat) ponderea de acumulare a cromului este mai înaltă la cultivare în regim de zi/noapte față de regimul de iluminare continuă, iar la suplimentarea lui în a 3-a zi de cultivare conținutul de crom acumulat în regim de zi/noapte se micșorează cu majorarea concentrației $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$, în limitele de 20-45 mg/l (Fig.2). În acest interval de concentrații se observă tendința de diminuare a acumulării cromului și la suplimentarea lui porționată la iluminare continuă. Astfel, conținutul de crom acumulat în biomasă la cultivare în regim de lumină/întuneric (14/10 ore) atinge valori mai înalte la suplimentarea porționată a compusului Cr(III). Un conținut maxim de crom în biomasă (1,013%) a fost înregistrat în acest caz la administrarea $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$, în concentrație de 40 mg/l.

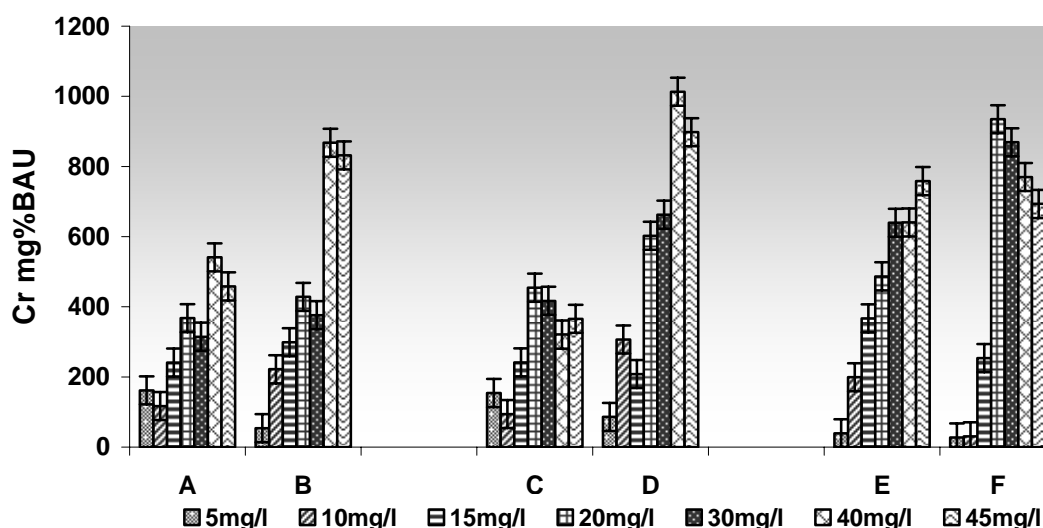


Fig.2. Conținutul de crom în biomasă de spirulină la suplimentarea în mediul de cultivare a glicinatului de crom în prima zi de cultivare (A, B), în rate (C, D) și în a treia zi de cultivare (E, F) la iluminare continuă (A, C, E) și în regim de iluminare zi/noapte (B, D, F).

Luând în considerare conținutul de crom total, raportat la cantitatea de biomasă recoltată/l de mediu nutritiv utilizat, putem constata că cu majorarea concentrației $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$ (10-30 mg/l), indiferent de regimul de cultivare, cantitatea cromului atestă valori care diferă nesemnificativ. La concentrații de 40-45 mg/l $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$,

cantitatea de crom acumulată în regim de iluminare 14/10 ore este net superioară, comparativ cu iluminarea continuă (a se vedea Tabelul).

Tabel

Cantitatea de crom acumulată în biomasa de spirulină la cultivare în două regimuri de iluminare la suplimentarea porționată a glicinatului de crom (în prima și a 3-a zi)

Concentrația Cr(Gly)Cl, g/l (M _r =309,5 g/mol)	Iluminare continuă	Fotoperioda 14/10	Iluminare continuă		Fotoperioda 14/10 ore	
			Conținutul cromului acumulat în biomasă			
	Productivitatea în a 10-a zi, g/l		Mg Cr/g biomasă	În total Cr**, mg	Mg Cr/g biomasă	În total Cr**, mg
5	1,050±0,02*	0,740±0,04*	1,54±0,07*	1,62±0,08*	0,86±0,03*	0,64±0,03*
10	1,175±0,03*	0,785±0,03*	1,94±0,07*	2,28±0,11*	3,06±0,13*	2,40±0,08*
15	1,225±0,05*	0,905±0,01*	2,42±0,10*	2,96±0,10*	3,08±0,05*	2,78±0,08*
20	1,350±0,06*	0,925±0,02*	4,17±0,08*	5,62±0,13*	6,03±0,08*	5,68±0,17*
30	1,450±0,07*	1,025±0,02*	4,55±0,13*	6,60±0,15*	6,63±0,13*	6,80±0,14*
40	1,350±0,05*	1,020±0,05*	3,21±0,15*	4,33±0,14*	10,13±0,25*	10,33±0,13*
45	1,150±0,04*	0,950±0,02*	3,65±0,13*	4,20±0,20*	8,98±0,12*	8,53±0,33*

*p≤0,05

**În total Cr – cantitatea de crom raportată la biomasa colectată din volumul de 1l de mediu nutritiv.

Rezultatele obținute demonstrează că în intervalul de concentrații 5-30 mg/l compusul coordinativ [Cr(Gly)₃]Cl nu exercită acțiune toxică asupra culturii de spirulină, fapt confirmat de acumularea biomasei cu majorarea concentrației. În cercetările efectuate anterior, cercetătorii chinezi au stabilit că bioacumularea Cr(III) la *Spirulina platensis* are loc în două etape: adsorbția rapidă și absorbția lentă. La aceeași concentrație de celule algale, bioacumularea Cr(III) crește cu concentrația Cr(III). Pe de altă parte, la o concentrație a Cr(III) neschimbată, bioacumularea totală a Cr(III) la *Spirulina platensis* crește cu concentrația celulară de alge, iar bioacumularea Cr(III) pe unitate de masă algală se reduce. De asemenea, s-a dovedit că bioacumularea Cr(III) este influențată pozitiv de creșterea temperaturii și intensității luminii [8].

Faptul că mecanismul de bioacumulare a Cr(III) la *Spirulina sp.* decurge în două etape este confirmat și de datele obținute de K.Chojnacka [4], care identifică acumularea pasivă, identică cu bioadsorbția, când ionii metalici interacționează cu site-urile de legare, prezente la suprafața celulelor și care este evaluată prin determinarea capacității de legare a ionilor de metale în exterior (q_{external}) și cea activă, care este o acumulare specifică, când ionii metalici sunt transferați în interiorul celulelor și ea este evaluată prin determinarea capacității de legare internă (q_{internal}). Datorită activității celulare, în cazul în care compoziția soluției îndeplinește criteriile de mediu de creștere minimală și nu exercită niciun efect toxic asupra celulelor, ionii de crom sunt transferați de la suprafața celulelor în interior [4], rezultând scăderea capacității de legare externă a ionilor metalici.

Cu toate că mecanismul de acumulare a cromului la *Spirulina platensis* a fost parțial elucidat, mai rămân neclarificate unele momente, cum ar fi: modul de stocare a cromului acumulat în celule, influența naturii ligandului din compusul coordinativ al Cr(III) asupra procesului de bioacumulare a cromului, precum și alți factori. Conform cercetărilor efectuate anterior, acumularea cromului are loc preponderent în fracția proteică [5,14].

Datele obținute în prezentul studiu ne permit să presupunem că în ambele regimuri de iluminare la administrarea porționată a glicinatului de Cr(III) în concentrații de până la 30 mg/l are loc preponderent acumularea intracelulară a cromului. Rezultatele cercetărilor similare cu utilizarea unor compuși coordinativi ai Cr(III) la cultivarea spirulinei în regim de iluminare confirmă dependența acumulării cromului de concentrație și termenul de administrare a compușilor Cr(III) în mediul de cultivare [6].

Studiile efectuate de unii cercetători asupra celulelor vii de *Spirogyra sp.* și *Spirulina sp.* scot în evidență faptul că ambele alge sunt în măsură să elimine metalele din soluție apoasă la concentrații mai diminuate. Se presupune că toxicitatea metalelor la concentrații mai înalte poate reduce capacitatea de bioacumulare a

microorganismelor. Microalgele se pot proteja împotriva toxicității cauzate de metale grele cu ajutorul mai multor mecanisme, cum ar fi: mecanismele de excludere, adsorbție la suprafața celulei sau acumulare intracelulară [9].

Astfel, putem presupune că la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* cu menținerea regimului de iluminare 14/10 ore în prezența unor concentrații mai înalte de 30 mg/l $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$ în condiții de stres are loc sinteza exopolizaharidelor sau altor componenți capabili de a adsorbi și stoca surplusul de crom pe suprafața celulelor. Prin aceasta și ar putea fi explicată acumularea maximă a cromului la concentrația de 40 mg/l. Totuși, pentru elucidarea acestei ipoteze sunt necesare experimente suplimentare.

Așadar, rezultatele cercetărilor efectuate demonstrează că este de perspectivă utilizarea glicinatului de crom – $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$ la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* pentru obținerea biomasei de spirulină cu conținut înalt de crom, care ar putea fi utilizată în calitate de supliment alimentar sau pentru extragerea unor biopreparate cu calități terapeutice înalte.

Concluzii

- Compusul coordinativ $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$ în limitele de concentrații 5-30mg/l manifestă un efect stimulator asupra productivității spirulinei în ambele regimuri de iluminare (continuă și cu fotoperioda 14/10 ore) și o toxicitate redusă asupra dezvoltării spirulinei, asigurând majorarea cantității de crom în biomasă cu creșterea concentrației.
- Cultivarea spirulinei în regim de iluminare continuă, indiferent de modul de suplimentare a glicinatului de crom, asigură o productivitate mai înaltă a spirulinei (până la 1,05-1,45 g/l) față de regimul zi/noapte (0,7-1,1 g/l), iar procesul de acumulare a cromului în biomasă este mai pronunțat la cultivare în regim zi/noapte la administrarea $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]\text{Cl}$ în rate (porționat în prima și a 3-a zi).

Bibliografie:

1. ABDEL-MONEM, M., ANDERSON, M. *Chromium (III) alpha amino acid complexes*. US patent 7247328. 2007.07.24
2. AZEEZ, P., BERNEJEE, D. Influence of light on chlorophyll, a content of blue green algae treated with heavy metals. In: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1987, no.38, p.1062-1069. ISSN 0007-4861
3. BELOKOBLYSKY, A., GINTURI, E., KUCHAVA, N. et al. Accumulation of selenium and chromium in the growth dynamics of *Spirulina platensis*. In: *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2004, no.259(1), p.65-68. ISSN 0236-5731
4. CHOJNACKA, K. Bioaccumulation of Cr(III) ions by Blue-Green alga *Spirulina* sp. Part I. A Comparison with Biosorption. In: *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 2007, vol.2, no.4, p.218-223.
5. CIUMAC, D. Stabilirea ponderii acumulării cromului în diferite fracții proteice din spirulina. În: *International Conference Of Young Researchers, IV Edition: Materialele Conferinței internaționale*. Chisinau, 2006, p.70.
6. CIUMAC, D. *Studiul modificării componenței biochimice a cianobacteriei Spirulina platensis la cultivare în prezența compușilor coordinativi ai Cr(III)*: Autoreferat al tezei de doctor, 2008, p.83-84.
7. FRONTASYEVA, M., PAVLOV, S., AKSENOVA, N. et al. Chromium interaction with blue-green microalga *Spirulina platensis*. In: *Journal of Analytical Chemistry*, 2008, vol.64, no.7, p.746-749. ISSN 1061-9348
8. LI, Z.Y., LI, Y.G., GUO, S.Y., LI, L., ZHANG, S.L. Study of the factors of Cr(III) bioaccumulation on *Spirulina platensis*. In: *Chinese journal of biotechnology*, 2000, vol.16, no.1, p.108-112.
9. MANE, P.C. and BHOSLE, A.B. Bioremoval of Some Metals by Living Algae *Spirogyra* sp. and *Spirulina* sp. from aqueous solution. In: *Int. J. Environ. Res.*, 2012, vol.6, no.2, p.571-576, ISSN: 1735-6865
10. MEHTA, S.K., GAUR, J.P. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. In: *J. Crit. Rev. Biotechnol.*, 2005, vol.25, p.113-152.
11. OFFENBACHER, E.G., PI-SUNYER, F.X. Beneficial effect of chromium-rich yeast on glucose tolerance and blood lipids in elderly subjects. In: *Diabetes*, 1980, vol.29, no.11, p.919-925.
12. PANDA, S.K. The biology of oxidative stress in green cells: A Review. In: Panda S.K. (ed). *Advances of stress physiology of plants*, 2002, p.1-13. Scientific Publishers, Jhodpur, India.
13. PANDA, S.K., CHAUDHURY, I., KHAN, M.H. Heavy metals induce lipid peroxidation and affects antioxidants in wheat leaves. In: *Biol. Plant*, 2003, vol.46, p.289-294.
14. RUDIC, V. et al. Ficobiotehnologie, cercetări fundamentale și realizări practice. Chișinău: S.n., Tipogr. „Elena V.I.” SRL, 2007. 365 p. ISBN 978-9975-9892-5-1
15. RUDIC, V., GULEA, A., BULIMAGA, V. et al. Efectul stimulator al compușilor coordinativi ai cromului (III) asupra productivității spirulinei. În: *Studia Universitatis. Seria „Științe ale naturii”*, 2007, nr.1, p.116-119. ISSN 1857-1735

16. RUDIC, V., BULIMAGA, V., CIUMAC, D. et al. Spectrul aminoacid și componența calitativă a proteinelor la spirulina cultivată în prezența unor compuși coordinativi ai Cr(III). În: *Buletinul AȘM. Seria „Științele vieții”*, 2008, nr.2(305), p.102-108. ISSN 1857-064X
17. STANIEK, H., KREJPCIO, Z., IWANIK, K. et al. Evaluation of the Acute Oral Toxicity Class of Trinuclear Chromium(III) Glycinate Complex in Rat. In: *Biol Trace Elem Res.*, 2011, vol.143, no.3, p.1564-1575.
18. STOUT, M.D., NYSKA, A., COLLINS, B.J. et al. Chronic toxicity and carcinogenicity studies of chromium picolinate monohydrate administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice for 2 years. In: *Food Chem. Toxicol.*, 2009, vol.47, p.729-733.
19. TORZILLO, G., SACCHI, A., MATERASSI, R. Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. In: *Bioresource Technology*, 1991, vol.38, no.2-3, p.95-100.
20. VINCENT, J.B. The potential value and toxicity of chromium picolinate as a nutritional supplement, weight loss agent and muscle development agent. In: *Sports Medicine*, 2003, vol.33, no.3, p.213-230.
21. WANI, S., WESKAMP, C., MARPLE, J., SPRY, L. Acute tubular necrosis associated with chromium picolinate-containing dietary supplement. In: *The Annals of Pharmacotherapy*, 2006, vol.40, no.3, p.563-566.
22. НЕЧАЕВА, С., МАЗО, В., ЖАВОРОНКОВ, В., БУЛГАКОВ, Ш. Способ получения сине-зеленой микроводоросли *Spirulina*, обогащенной микроэлементами. Патент RU 2144078. 1998.02.17.

Prezentat la 05.10.2015