

Estudio fisicoquímico, microbiológico y toxicológico de los polisacáridos del *nostoc commune* y *nostoc sphaericum*

B. Jurado T.¹, C.M. Fuertes R.², G.E. Tomas Ch.³, E. Ramos LL.⁴, J.L. Arroyo A.⁵, J.R. Cáceres P.⁶, M.A. Inocente C.⁷, B. Alvarado Ch.⁸, B.M. Rivera C.⁹, M. A. Ramírez O.¹⁰, H. Ostos F.¹¹, L. Cárdenas M.¹²

(Recibido: 26/05/2014 / Aceptado: 20/07/2014)

RESUMEN

El presente trabajo de investigación es una contribución al aprovechamiento industrial de las algas cianofitas del género *Nostoc* como aditivo viscosante para la elaboración de productos alimenticios. En el estudio se realizó la recolección, estabilización y extracción de polisacáridos de muestras de Junín, Ancash, Cajamarca y Pachacamac (Lima). Así mismo se realizó el análisis fisicoquímico, microbiológico y toxicológico, con la finalidad de garantizar su inocuidad y seguridad para el consumo humano. Los resultados son: pH neutro: 7,115 (*N. sphaericum*) y 7,679 (*N. commune*). El análisis de la viscosidad de *N. sphaericum* dio un mayor valor de 38,3 cps, mientras que en *N. commune* obtuvo 4.5 cps. El punto de gelificación dio un mayor valor para *N. sphaericum* comparado con *N. commune*. En el análisis microbiológico se encontró ausencia de microorganismos patógenos. La dosis letal 50 en ratones fue sobre los 1500 mg/kg para el *Nostoc sphaericum* en tanto que para *Nostoc commune* fue sobre 2000 mg/kg. Los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y toxicológicos nos indican que los polisacáridos extraídos están dentro de los parámetros aceptables.

Palabras clave: *Nostoc commune*, *Nostoc sphaericum*, polisacáridos, viscosidad, punto de gelificación, análisis toxicológico y microbiológico.

Study physicochemical, microbiological and toxicological polysaccharides of *nostoc commune* and *nostoc sphaericum*

ABSTRACT

The investigation is a contribution to the industrial use of algae cyanobacteria of the genus *Nostoc* plasticizer additive for food processing. The study undertook the collection, stabilization and extraction of polysaccharide, samples of Junín, Ancash, Cajamarca and Pachacamac (Lima). Also, the physicochemical, microbiological and toxicological analysis was performed in order to ensure their safety and security for human consumption. The results are: pH neutroph: 7.115 (*N. sphaericum*) and 7.679 (*N. commune*). Viscosity analysis *N. sphaericum* gave a higher value of 38.3 cps, while the *N. commune* gained 4.5 cps. The gel point gave greater value for *N. sphaericum* compared with *N. commune*. In the microbiological analysis found no pathogenic microorganisms. The LD 50 in mice would be about 1500 mg / kg for the *Nostoc sphaericum* whereas for *Nostoc commune* would be about 2000 mg/kg. Physicochemical parameters, microbiological and toxicological studies indicate that polysaccharides extracted are within acceptable parameters.

Keywords: *Nostoc commune*, *Nostoc sphaericum*, polysaccharides, viscosity, gel point, toxicological and microbiological analysis.

- 1 Lab. Farmacognosia y Medicina Tradicional — Instituto Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Júan de Dios Guevara”. Facultad de Farmacia y Bioquímica, bjurado@hotmail.com
- 2 Lab. Química Orgánica — IICF y RN “Júan de Dios Guevara”. FF y B, cfuertes@unmsm.edu.pe
- 3 Dpto. de Química Orgánica, FQIQ-UNMSM, gloriaeva7@hotmail.com
- 4 Lab. de Botánica - IICF y RN “Júan de Dios Guevara”. FF y B aqpany@yahoo.com
- 5 Lab. Farmacología, Facultad de Medicina Humana, jorgeluis_arroyoacevedo@yahoo.com
- 6 Vicerrectorado de Investigación, Universidad Nacional del Callao, jcaceres@unac.pe
- 7 Facultad Medicina Humana, USMP, ayruocosmetic@empresarios.com
- 8 Universidad Garcilaso de la Vega, FF y B, qfbrittalvaradochavez@hotmail.com
- 9 Lab. Química Orgánica — IICF y RN “Júan de Dios Guevara”. FF y B, betsabeth2011@gmail.com
- 10 IICF y RN “Júan de Dios Guevara”. FF y B, martnalejandro.ramirezobregna@gmail.com
- 11 IICF y RN “Júan de Dios Guevara”. FF y B, henry_haof@hotmail.com
- 12 Lab. Química Orgánica — IICF y RN “Júan de Dios Guevara”. FF y B, dea_air@hotmail.com

I. INTRODUCCIÓN

El género *Nostoc* comprende algas Cianofitas, tales como *Nostoc commune* y *Nostoc sphaericum*, que crecen en forma silvestre cerca de los ríos, lagos y lagunas, en el interior del país sobre todo en la región puna. Lutgardo^[1] ha extraído y caracterizado el polisacárido de *Nostoc sphaericum*, recomendando su aplicación como aditivo viscosante alimentario.

La mayoría de agentes viscosantes utilizados como aditivos son sintéticos, por lo cual se encuentra en observación su inocuidad para el ser humano; y varios viscosantes son dirigidos hacia determinados alimentos procesados.

Las algas cianofitas son consumidas en alimentos de la zona sierra de nuestro país; además, se encuentra en forma silvestre. Se considera entonces una manera natural y económica para obtener un aditivo viscosante que permitiría reducir los costos para la industrialización de este insumo requerido para la industria alimentaria y farmacéutica; en consecuencia, beneficiaría a las poblaciones cercanas a las zonas donde crece promoviendo así su cultivo y cosecha para su transformación industrial.

Hori^[2] determinó que la absorción de los aditivos de color y volumen de sedimentación en el agua por las algas *Nostoc commune* presentaron un elevado volumen de sedimentación, gracias a ello sugieren que ésta alga puede tener una importancia nutricional como fuente de fibra dietética y como aditivo viscosante en la elaboración de productos alimenticios.

En la elaboración de los alimentos es necesario el uso de sustancias denominadas aditivos alimentarios, estas sustancias se utilizan con fines de manejo del proceso tecnológico, mejorar las características organolépticas o aumentar el tiempo de vida útil. Dentro del grupo de los aditivos alimentarios se encuentran los denominados viscosantes o estabilizantes, sustancias que cumplen la función de aumentar la viscosidad de los alimentos, de esta forma desde el punto de

vista físico mantienen distribuidos uniformemente los sólidos y desde el punto de vista organoléptico mejoran el aspecto y la textura de los alimentos (Codex Alimentario).^[3]

La tendencia actual en la elaboración de los alimentos es el uso de los aditivos naturales, orientado a la demanda de los consumidores. Por esta razón los esfuerzos de la investigación se dirigen hacia la búsqueda de aditivos naturales y su introducción al mercado.

El objetivo del trabajo fue obtener un agente viscosante natural a partir de algas cianofitas *Nostoc commune* y *Nostoc sphaericum* mediante la extracción de los polisacáridos para una potencial aplicación en la industria alimentaria.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Recolección y clasificación taxonómica.

La recolección se realizó en mayo, en Cajamarca, Ancash, Huancayo y Lima (Pachacamac). El Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos realizó la clasificación taxonómica según el ordenamiento sistemático de Guiry.

Extracción y Purificación de polisacáridos

Las muestras seleccionadas fueron almacenadas a 0-3°C hasta su deshidratación parcial. Luego fueron licuadas con agua destilada para obtener una mejor ruptura de las capas de polisacáridos. Luego se sometió a calentamiento a 80 °C por 30 minutos. Se enfrió y se filtró en tela. Al filtrado se le agregó etanol, obteniéndose un precipitado en forma de flóculo. Luego se sometió a secado a 40°C. Finalmente se redisolvió el precipitado en agua destilada y se trató con etanol 1:3, obteniéndose un flóculo.

Análisis fisicoquímico de los polisacáridos de *Nostoc*

- **Determinación de pH.** Se disolvió el polisacárido al 10 % en agua destilada a 80°C con agitación constante; se enfrió,

midió el pH en el equipo pH METRO HANNA MOD.: HI-8424 utilizando un electrodo de vidrio.

- **Determinación de solubilidad.** Se determinó con diferentes solventes: agua destilada fría y caliente, etanol, metanol y diclorometano.
- **Determinación de la viscosidad.** Se preparó la muestra al 2% del polisacárido en agua destilada y se colocó en el Viscosímetro Brookfield LV.
- **Punto de Gelificación.** Se obtuvo por método Volumétrico.

Análisis microbiológico

Se realizó mediante el método de la International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiological Societies (ICMSF)^[4].

Análisis de metales

Se realizó la cuantificación de plomo, mercurio, arsénico, cobre, calcio, magnesio por Absorción Atómica (AA-6700), según los métodos GFAAS-USAQ-ME-15 y FAAS-USAQ-ME-04). Se pesó aproximadamente 0,2 g de muestra, en un vaso de 150 mL, se agregó 10 mL de HNO₃ cc., se redujo el volumen hasta casi sequedad, luego de enfriar durante 10 minutos, se añadió 5 mL de HClO₄ y se llevó a sequedad para luego enrasarlo en una fiola de 50 mL.

Determinación de solvente residual de Etanol

Por Cromatografía de Gases (CG).

Análisis toxicológico

Para el estudio de toxicidad a dosis única se ha adquirido ratones machos cepa Balb C57 del Instituto Nacional de Salud, con peso promedio de 19 ± 2 g al inicio del experimento, los cuales fueron mantenidos en un cuarto a temperatura controlada de 20 ± 2 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 12-12 h. Para el

estudio de toxicidad a dosis repetidas fueron adquiridas 20 ratas, siendo diez machos (195 ± 5 gramos de peso corporal) y diez hembras (180 ± 4 gramos de peso corporal).^[5] Los ratones fueron distribuidos al azar en grupos de seis cada uno, se les administró el extracto A (*Nostoc sphaericum*) por vía oral, así mismo, se administró el extracto B (*Nostoc commune*) en ratones. Los animales fueron observados por un período de 14 días, registrando cualquier síntoma tóxico.^[1]

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras de "cushuro" fueron recolectadas en Junín (Huancayo), Ancash (Huaraz), Cajamarca y Lima (Pachacamac). De los cuales se recolectó *Nostoc* Tipo I y *Nostoc* tipo II. (Fig. 1)

Clasificación taxonómica.

DIVISIÓN : Cianobacteria = Cyanophyta

CLASE : Cyanophyceae

ORDEN : Nostocales

FAMILIA : Nostocaceae

GÉNERO : *Nostoc*

ESPECIES : *Nostoc sphaericum* Vaucher ex Bornet & Flahault

Nostoc commune Vaucher ex Bornet & Flahault

Los nombres científicos correspondientes son (Fig. 2):

- Cushuro de Junín-Huancayo (forma esférica): *Nostoc sphaericum*
- Cushuro de Ancash- Huaraz tipo I (forma esférica): *Nostoc sphaericum*
- Cushuro de Ancash- Huaraz tipo II (formalechuga): *Nostoc commune*
- Cushuro de Cajamarca - San Nicolás (formalechuga): *Nostoc commune*
- Cushuro de Lima - Pachacamac (forma lechuga): *Nostoc commune*



Figura 1. Recolección de algas Nostoc en lagunas de Huaraz(A). "Cushuro" tipo I (forma esféricas) (B). "Cushuro" tipo II (forma lechugas) (C)



Figura 2. Muestras de "cushuro" recolectadas de Junín (Huancayo), Ancash (Huaraz), Cajamarca y Lima (Pachacamac)

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

Rainer en su estudio de la investigación estructural de un polisacárido de *Nostoc insulare*, realizaron la extracción, centrifugado y concentración por rotavapor, el cual difiere de nuestro método ya que para el desecado de la muestra se hizo por deshidratación en frío; se realizó la selección, lavado y licuado como primer método de extracción.^[6]

Li en su estudio de Actividad antioxidante y retención de humedad de los polisacáridos del *Nostoc commune*, realizó al final del proceso la eliminación de proteínas mediante el método de Sevag para purificar el polisacárido.^[7] Nuestro método la purificación se realizó mediante precipitación con etanol de 96° formando flóculos blancos que luego se llevó a secar a 40 °C. (Fig. 4).

Análisis fisicoquímico:

- Solubilidad. Soluble en agua destilada a 80°C e Insoluble en agua destilada fría, etanol, metanol y diclorometano.
- Determinación de pH, con potenciómetro. A Temperatura de 38° C se obtuvo pH: 7,115 (N. sphaericum) y 7,279 (N. commune)
- Determinación de la Viscosidad y Punto de gelificación. Huang determinó que el

Nostoc sphaericum presentó: L-ramnosa, D-fructuosa, D-xilosa y D-galactosa, polisacáridos y monosacáridos solubles en agua caliente, fueron separados por cromatografía de intercambio aniónico en fracciones neutras y ácidas^[8]. Además, se probó la alta viscosidad de los polímeros que podrían ser adecuados para uso industrial. Coincidimos con los resultados de estos estudios, ya que los valores de viscosidad y punto de gelificación de *Nostoc sphaericum* es mayor al de *Nostoc commune* (Tabla 1). Tales valores nos indican que podrían mejorar la textura de los alimentos, reemplazando a las sustancias químicas que le ayudan a dar viscosidad, valorando a esta especie su poder como viscosante natural.^[8]

Análisis microbiológico

Los resultados mostraron que están libres de microorganismos patógenos como *E. coli*, *St. aureus*, *Salmonella sp.* (Tabla 2).

Tabla 1. Viscosidad y Punto de gelificación de Nostoc

Prueba	<i>Nostoc sphaericum</i>	<i>Nostoc commune</i>
Viscosidad	38,3 cps	4,5 cps
Gelificación	Esterificación a 75,013% - T° 85	Esterificación a 8,812% - T° 85

Tabla 2. Análisis microbiológico de Nostoc

Pruebas	Especificaciones	<i>Nostoc sphaericum</i>	<i>Nostoc commune</i>
Recuento total de aerobios mesófilos viables	-----	>1600000 ufc/ g	91500 ufc/ g
Recuento de Mohos y Levaduras	-----	>1600000 ufc/ g	80000 ufc/ g
Rcto. de Coliformes totales	-----	<3NMP/ g	<3NMP/ g
Rcto. de Enterobacterias Gram (-)	-----	1450 ufc/ g	250 ufc/ g
E. coli	Ausente en 10 g.	Ausente en 10 g.	Ausente en 10 g.
St. aureus	Ausente en 10 g.	Ausente en 10 g.	Ausente en 10 g.
Bacillus cereus	Ausente en 10 g.	Ausente en 10 g.	Ausente en 10g.
Salmonellaspp.	Ausente en 25 g.	Ausente en 25 g.	Ausente en 25 g.
Clostridium Sulfito Reductores	Ausente en 10 g.	Ausente en 10 g.	Ausente en 10 g.

Análisis químico bromatológico

Según Aldave,^[9] en las algas procedentes de Huaraz los valores de proteínas y sales minerales son más elevados en la masa seca en relación a la masa fresca. Felix obtuvo para Nostoc deshidratado: 29 g de proteínas, grasa 0,5 g, hidrato de carbono 46,9, calcio 147 mg, fósforo 64 mg, hierro 83,6 mg, sodio 1,021 mg y potasio 483 mg por ciento respectivamente.^[10]

En nuestro estudio se utilizó muestra fresca del género Nostoc y se llevó a congelación para su deshidratación. El contenido de metales estuvo dentro de los parámetros normales, encontrándose calcio 20879,53 mg/L, hierro/549,07 mg/L, zinc/246,15 mg/L, potasio 3299,58 mg/L y magnesio 3817,27 mg/L (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de metales en los polisacáridos de Nostoc, expresados en ppm

Metales	<i>Nostoc sphaericum</i>	<i>Nostoc Commune</i>
Plomo	101,64	N.D.
Cromo	N.D.	N.D.
Cadmio	N.D.	N.D.
Mercurio	18,80	6,71
Arsénico	N.D.	N.D.
Calcio	13659,55	20879,53
Hierro	100,09	549,07
Zinc	87,42	246,15
Potasio	24467,88	3299,58
Magnesio	12010,66	3817,27
Cobre	96,35	N.D.

N.D.= No detectable

Tabla 4. Toxicidad aguda hasta los ocho días al administrar por vía oral el extracto A (*Nostoc sphaericum*) en ratones

N	Tratamiento	n	Dosis	Muertos	Vivos
1	Suero fisiológico	6	10 mL/kg	0	6
2	Extracto A	6	50 mg/kg	0	6
3	Extracto A	6	100 mg/kg	0	6
4	Extracto A	6	250 mg/kg	0	6
5	Extracto A	6	500 mg/kg	0	6
6	Extracto A	6	1000 mg/kg	0	6
7	Extracto A	6	1500 mg/kg	0	6
8	Extracto A	6	2000 mg/kg	3 a partir del octavo día	3

Tabla 5. Toxicidad aguda hasta las 48 horas al administrar por vía oral el extracto B (*Nostoc commune*) en ratones

N	Tratamiento	n	Dosis	Muertos	Vivos
1	Suero fisiológico	6	10 mL/kg	0	6
2	Extracto B	6	250 mg/kg	0	6
3	Extracto B	6	500 mg/kg	0	6
4	Extracto B	6	1000 mg/kg	0	6
5	Extracto B	6	1500 mg/kg	0	6
6	Extracto B	6	2000 mg/kg	0	6

Tabla 6. Toxicidad a dosis repetidas al administrar por vía oral el extracto A (*Nostoc sphaericum*) en ratas normales hasta el octavo día de administración

Animal de experimentación	n	Tratamiento	Dosis	
1	Macho	5	Suero fisiológico	4 mL/kg
2	Hembra	5	Suero fisiológico	4 mL/kg
3	Macho	5	Extracto A	100 mg/kg
4	Hembra	5	Extracto A	100 mg/kg

Determinación de etanol residual

Los polisacáridos de *Nostoc sphaericum* y *Nostoc commune* resultaron estar libres de solventes residuales.

Determinación de Toxicidad

Inicialmente los animales que recibieron dosis altas (2000 mg/kg) presentaron piloerección, luego de 24 horas regresaron a su estado normal, en tanto que al octavo día, 3 de los ratones que recibieron dosis altas empezaron a presentar signos de apatía, depresión neurológica progresiva hasta llevarlos a la muerte (Tabla 4). Hasta las 48 horas no se evidenció signos irritabilidad neurológica u otro que indique toxicidad, así como no hubo muertes por administración oral del extracto B (*Nostoc commune*) en tales ratones (Tabla 5).

Hasta el octavo día de administración diaria de 100 mg/kg se observó que las condicio-

nes físicas de las ratas no revelaron cambios fisiológicos que se relacionen con eventos de toxicidad (Tabla 6).

En la tabla 4 se observa que a partir del octavo día han muerto tres de los ratones machos (50%) lo que indica que la dosis letal 50 está sobre los 1500 mg/kg.

La dosis letal 50 en ratones y por administración oral para el extracto A (polisacáridos de *Nostoc sphaericum*) fue sobre los 1500 mg/kg hasta el octavo día; en tanto que para el extracto B (*Nostoc commune*) fue sobre 2000 mg/kg hasta las 48 horas de observación.

No se ha observado cambios fisiológicos hasta el octavo día de administración del extracto A (*Nostoc sphaericum*) en dosis de 100 mg/kg aplicadas en ratas normales.

La validación científica de las plantas medicinales toma gran importancia una vez

detectada su actividad biológica dentro del desarrollo de un nuevo fármaco, porque no podemos limitarnos a la sabiduría popular. La seguridad, eficacia e inocuidad se debe tener en cuenta porque algunas sustancias presentes podría presentar efectos tóxicos indicaron estos efectos tóxicos que fueron evaluados en nuestro estudio.^[11-13]

En el análisis toxicológico de los polisacáridos extraídos del *N. sphaericum* y *N. commune* se empleó el test de dosis límite; metodología y diseño experimental descrito por las normas EPA (Agencia de Protección Ambiental) 870.1100, OECD (Organización Económica para el Comercio y Desarrollo). Como resultado no se observó cambios compatibles con evidencias de toxicidad o evento adverso (tablas 4, 5 y 6); por ello la dosis letal 50 (DL50) estuvo sobre los 2000 mg/kg. Lógicamente es un indicador para posteriores estudios de seguridad como el conocer la toxicidad a dosis repetidas, eventos de genotoxicidad, etc.^[14-15]

Los polisacáridos del *N. commune* presentó un elevado poder antioxidante en la captación de aniones superóxido y radicales hidroxilo de manera dosis-dependiente.^[7] Además, se demostró que el tratamiento con el polisacárido puede aumentar las actividades de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPX) y disminuir el contenido de la peroxidación lipídica producto de la MDA. En conjunto, estos resultados demuestran la potente actividad antioxidante in vitro como in vivo; por lo tanto proporcionan evidencia crucial para su posible aplicación en los alimentos, industria farmacéutica y cosmética.

Resultados de nuevos estudios Rasmussen demostraron que la suplementación en los alimentos con *N. commune* redujo significativamente los niveles de colesterol total en plasma y las concentraciones de triglicéridos 20% en comparación con los controles, a su vez ejerció un efecto hipocolesterolémico en ratones, en gran parte por reducción de la absorción intestinal del colesterol y favoreció la excreción fecal de esteroides.^[16] El desarrollo de productos alimenticios

elaborados en base a los polisacáridos de esta alga serviría como un alimento nutritivo, además de reducir grasas y colesterol.^[16]

IV. CONCLUSIONES

Es conveniente trabajar con las muestras de Ancash (Huaraz) y Pachacamac (Lima) por ser de fácil obtención, en especial en Ancash, donde se dedican al cultivo natural sostenible.

El método de extracción de los polisacáridos de algas cianofitas *Nostoc sphaericum* y *Nostoc commune* es sencillo, de bajo costo, lo cual facilita la extracción a escala industrial.

Los parámetros fisicoquímicos tales como pH, viscosidad y punto de gelificación demostraron que el *N. sphaericum* presentó mejores valores que el *N. commune*.

Los parámetros microbiológicos mostraron ausencia de microorganismos patógenos.

Los análisis toxicológicos realizados, toxicidad aguda a Dosis Letal 50 en ratones y a dosis repetida en ratas por vía oral no mostraron cambios fisiológicos que se relacione con eventos de toxicidad.

V. AGRADECIMIENTOS

Proyecto subvencionado por el CONCYTEC a través de FONDECYT (contrato de subvenciones N° 282-2010-CONCYTEC-OAJ).

A los colaboradores: Q.F. Christian Palomino, Lic. Química Mirian Palomino, Biólogo Christian Florián, Biólogo Mario Benavente, Biólogo José Campos y Q.F. Rubén Flores.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lutgardo A., Tillán J., Cabrera Y. Toxicidad aguda oral del extracto fluido de *Mentha spicata* L. (hierbabuena). Rev. Cubana Plant. Med., 1997; 2(2):6-8
- [2] Hori K., Mohri, T., Okita T. Absorption of color additives and settling volume in water of blue-green alga, *ishikurage* (*Nostoc commune*). Plant. Foods Hum. Nutr. 1992;42(1):31-6.

- [3] Norma General del Codex para Aditivos Alimentarios. CODEX STAN 192-1995
- [4] ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the international Union of Microbiological Societies). Microorganisms in Foods. Their significance and methods of enumeration, 2^a ed. Editorial: University of Toronto Press. Traducción Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. 2000.
- [5] Barragry TB. Veterinary Drug Therapy. Lea & Febiger, U. S. A., 1994:23-25.
- [7] Rainer V., Kathrin V. Structural investigation of a polysaccharide released by the Cyanobacterium *Nostoc insulare*. J. Appl. Phycol. 2007; 19:255-262.
- [8] Li H., Xu J., Liu Y., Aia S., Qina F., Li Z. Antioxidant and moisture-retention activities of the polysaccharide from *Nostoc commune*. J. Carbohydr. Polym. 2011; 83(4):1821–1827.
- [9] Huang Z., Liu Y., Smestad B., Klavness D. Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with different colony morphologies: comparison of mono-saccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. J. Appl. Phycology. 2002; 34 (6):962-968.
- [10] Aldave A. Algas. Trujillo. Editorial Libertad. 459 p. 1989.
- [11] Felix N. Los alimentos en el Perú. Rev. Peruana Cardiología. 2000; 26(2):94-119.
- [12] Morón F. Plantas medicinales y medicamentos herbarios. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2002.p. 195-205.
- [13] Martínez E., Martínez M., Millán M., Ramírez P. Determinación de toxinas biológicas en una fuente de abastecimiento de agua dulce. Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 28, Cancún, 27 oct.-1 nov. 2002
- [14] Vassallo J. Comunidades de cianobacterias bentónicas, producción y liberación de microcistinas en el Río Muga (en Península Ibérica). Tesis doctoral en Ciencias. Girona 2009.
- [15] OECD. Guideline No. 420 Acute oral toxicity – fixed Dose Procedure. Francia: Guideline for Testing of Chemicals, Inc.; 2007
- [16] OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for testing of chemicals. Guideline No. 420: Acute oral toxicity class method, Paris; 2002; 5-6.
- [17] Rasmussen H., Blobaum K., Jesch E., Ku C., Park Y., Lu F., Carr T., Lee J. Hypocholesterolemic effect of *Nostoc commune* var. *sphaeroides* Eur J. Nutr. 2009; 48:387-394.