ARTÍCULO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

Composición bioquímica y toxicidad de colonias comestibles de la cianobacteria andina *Nostoc* sp. Llayta

Biochemical composition and toxicity of edible colonies of the cyanobacterium *Nostoc* sp. Llayta

RESUMEN

Llayta es el nombre asignado a la biomasa seca de macrocolonias de una cianobacteria filamentososa, clasificada como *Nostoc* sp. Llayta crece en humedales andinos de Sudamérica y ha sido considerada como un ingrediente alimenticio desde tiempos precolombinos. Este estudio pretende contribuir a la definición de la calidad nutritiva de la Llayta, proporcionando información sobre su composición bioquímica e identificar aspectos críticos de interés toxicológico. Los resultados mostraron que el 60% del total de sus aminoácidos son indispensables, contenía un 2% de lípidos totales, 32% del total de ácidos grasos eran poliinsaturados, la vitamina E fue la más abundante (4,3 mg%), el contenido de polifenoles totales es 64 mg equivalentes de ácido gálico, su actividad antioxidante es 17,4 μ moles equivalentes de Trolox, la fibra total fue el 56% del peso seco y presentó un contenido promedio de arsénico total de $9,2 \pm 5,4$ ppm. Esta cianobacteria no es productora de microcistina, por lo que las colonias de la Llayta podrían considerarse inocua para el consumo humano. Palabras clave: Llayta; microalgas andinas; arsénico; microcistina; *Nostoc*.

ABSTRACT

Llayta is the name assigned to the dry biomass of macrocolonies of a filamentous cyanobacterium classified as *Nostoc* sp. Llayta grows in the Andean wetlands of South America and has been considered a food ingredient since pre-Columbian times. This work is an effort to contribute to define the nutritional quality of Llayta providing information on its biochemical composition and to identify key toxicological aspects. The results indicated that 60% of its aminoacids were indispensable, total lipids were 2% of dry weight, polyunsaturated fatty acids were 32% of total fatty acids, vitamin E was the most abundant (4.3 mg%), total polyphenols were 64 mg (equivalent to galic acid), antioxidant activity was 17.4 μ moles (equivalent to Trolox), total fiber was 56% of dry weight and accumulated 9.2 ± 5.4 ppm of total arsenic. Since *Nostoc* sp. Llayta is a cyanobacterium strain that does not synthesize the cyanotoxin microcystin, the Llayta colonies can be considered innocuous

Alexandra Galetovic^{1,3}, Jorge E. Araya^{2,3},
Benito Gómez-Silva^{1,3}.

1. Laboratorio de Bioquímica, Depto. Biomédico,
Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta, Chile.
2. Laboratorio de Parasitología,
Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta, Chile.
3. Centro de Biotecnología y Bioingeniería, CeBiB,
Universidad de Antofagasta, Chile.

Dirigir correspondencia a: Benito Gómez-Silva, Depto. Biomédico,
Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta.
55-2637503; 998297844.
E-mail: benito.gomez@uantof.cl

Este trabajo fue recibido el 22 de mayo de 2017.
Aceptado con modificaciones: 31 de julio de 2017.
Aceptado para ser publicado: 20 de agosto de 2017.

for human consumption.

Key Words: Llayta; Andean microalgae; arsenic; microcystine; *Nostoc*.

INTRODUCCIÓN

El consumo de cianobacterias y microalgas es un legado heredado de civilizaciones en diversas regiones de nuestro planeta (Asia, África, Norteamérica y Sudamérica) que continua siendo una importante contribución a la dieta

humana¹⁻⁵. Representantes de los géneros *Arthrospira* en África y Norteamérica, y *Nostoc* en Asia y Sudamérica, son dos ejemplos de la utilización de este tipo de recursos naturales^{4,5}. El cultivo masivo de otros géneros (*Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*) demuestra que estos microorganismos pueden ser fuente de metabolitos de interés comercial. Los contenidos de proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos poliinsaturados y carotenoides, confirman que estos microorganismos son ingredientes y suplementos alimenticios de calidad⁴⁻⁸.

La limitada biodiversidad y baja abundancia de recursos hidrobiológicos en el Desierto de Atacama, a consecuencia de la sequedad ambiental, se contraponen con la región alto-andina, con precipitaciones anuales 10-60 veces superior a la zona desértica central, y una mayor riqueza de recursos que las comunidades andinas han utilizado en alimentación, forraje y etnomedicina desde épocas remotas⁹⁻¹¹. En la práctica alimentaria andina, el recurso Llayta ha sido un ingrediente natural consumido desde tiempos precolombinos^{1,2}. El vocablo Llayta es de origen Aymara y existen otros alternativos en idioma Aymara, Quechua, Español, Kunza y Mapuche (chuncuro, chucula, luche, entre otros), evidenciando la diversidad cultural y antropológica de esta práctica alimentaria^{1,2,11-14}.

La Llayta es la biomasa seca de macrocolonias laminares formadas por el crecimiento de una cianobacteria filamentosas, fijadora de nitrógeno atmosférico, que ha sido aislada, purificada y clasificada como miembro del género *Nostoc* en base a la secuencia parcial de su gen ARNr 16S y que está depositada en el banco de datos de NCBI bajo el número de acceso HM988727.1. Además, esta cianobacteria, denominada *Nostoc sp. Llayta*, es parte de la colección del Servicio de Cultivos Biológicos, Centro de Investigaciones Isla de la Cartuja, Sevilla, España.

Las colonias de *Nostoc sp. Llayta* crecen en bofedales y vegas andinas sobre los 3.000 msnm y una vez cosechadas y secadas al sol, son comercializadas en los mercados de abasto en Tacna, Perú, y de Arica e Iquique, Chile³. La biomasa seca de la Llayta es de color verde oscuro debido al abundante contenido de clorofila y la presencia de escitonemina, un pigmento protector a la luz ultravioleta¹⁵.

La Llayta es un ingrediente alimenticio ancestral de la cultura andina; por ello, es razonable pensar que las poblaciones andinas la han consumido por generaciones debido a que sería un ingrediente no-tóxico y nutritivo. Sin embargo, la calidad nutritiva, la eventual presencia de tóxicos y su real contribución a la dieta humana no han sido claramente establecidas. El objetivo de este trabajo es proporcionar información sobre la composición bioquímica de la Llayta e identificar aspectos críticos de interés toxicológico de este recurso natural andino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen y obtención de muestras de Llayta

Las colonias de la Llayta recolectadas en diversos bofedales altoandinos de Perú y Chile se secan al sol y están disponibles

en el mercado hortofrutícola de Arica para su comercialización en bolsas plásticas con 20-25 g del producto. En base a la información recogida en entrevistas con los vendedores, existe escasa precisión acerca de los sitios específicos y épocas del año en que se realiza la recolección de la Llayta; además, el período de almacenaje del producto comercial es variable, depende de la demanda y se extiende por aproximadamente 6-12 meses. En consecuencia, el conjunto de las muestras que se usaron en el estudio bioquímico de la Llayta representa al producto disponible para la venta durante los años 2014-2015. Las muestras de la Llayta que se usaron para determinar el contenido de arsénico total se obtuvieron en el mercado de Arica durante el período 2013-2016. Finalmente, las muestras de la Llayta se almacenaron hasta su uso en la oscuridad, a temperatura ambiente y en su envase original.

Composición química de la biomasa de Llayta

Aproximadamente, 300 g de Llayta se pulverizaron en un homogenizador con hojas metálicas, hasta obtener un tamaño uniforme de partículas. Muestras en duplicado, con tres réplicas, se usaron para la determinación del contenido de proteínas, grasa, carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, fibra dietética, vitaminas y capacidad antioxidante. Muestras de un gramo se sometieron a extracción por el método de Kjeldhal para evaluar el contenido de proteínas totales expresado como porcentaje de nitrógeno proteico¹⁶. Los lípidos totales se midieron por el procedimiento Soxhlet, usando muestras de un gramo y CCl₄ como solvente¹⁷. El contenido de cenizas de la biomasa se evaluó por gravimetría, en duplicado. Las muestras de 2 g se mantuvieron por 24 h a 600 °C en una mufla hasta la obtención de cenizas¹⁷. El contenido de minerales metálicos y no-metálicos (sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre y arsénico), se cuantificó en muestras de un gramo de la Llayta, por espectrofotometría de absorción atómica¹⁷. El contenido de carbohidratos totales se determinó como porcentaje de extractos no-nitrogenados. Este valor corresponde al porcentaje del peso seco que se obtiene luego de restar los contenidos de proteínas, lípidos, humedad y cenizas^{16,17}.

Los otros análisis se realizaron en los laboratorios del Instituto de Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile, en duplicados independientes, con tres réplicas cada uno, de acuerdo a las metodologías utilizadas e informadas por este instituto. Los datos se expresaron como el promedio, con la respectiva desviación estándar con número de muestra mayor a dos^{18,19}.

A continuación se describe brevemente cada uno de los métodos utilizados: (a) el perfil y cuantificación de ácidos grasos se realizó por cromatografía gaseosa, con un detector FID (Detector de Ionización de Flama), de acuerdo a la metodología de la American Oil Chemists Society (AOCS Ce 1b-89)²⁰, (b) el contenido de vitaminas se determinó por cromatografía líquida de alta resolución HPLC, con detector de arreglo de diodos (DAD), según LCA-PRE-016, 018, 029, 034, para vitamina C, A, E y D3, respectivamente¹⁷, (c) el

contenido de la fibra dietética se determinó por un método enzimático-gravimétrico, de acuerdo a la metodología AOAC 991.43. Las muestras se digirieron secuencialmente con alfa-amilasa, proteasa y amiloglucosidasa para remover la proteína y el almidón. El contenido de la fibra total, fibra soluble y fibra insoluble se obtuvo luego de pesar los residuos precipitados con alcohol y corregir con los contenidos de proteínas y cenizas de cada uno de ellos²¹. (d) la capacidad antioxidante de la Llayta se midió como TEAC (capacidad antioxidante equivalente Trolox) por el método del ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), en extractos obtenidos en acetona/agua bidestilada (70/30 v/v), según la metodología descrita por Re et al. (1999)²². La técnica consiste en generar una especie radicalaria del compuesto ABTS y medir su absorbancia a 734 nm. La adición de antioxidantes decrece el valor de absorbancia debido a la reducción y desaparición del radical ABTS. Mediante una curva de calibración para Trolox (antioxidante hidrosoluble y análogo a la vitamina E), la actividad antioxidante de la muestra se expresó como micromoles equivalentes de Trolox[®] por 100 g de biomasa²³, (e) el contenido de polifenoles totales de la Llayta se midió fotométricamente utilizando el método de Folin-Ciocalteu en extractos obtenidos en acetona/agua bidestilada (70/30 v/v). Para esto, se construyó una curva de calibración con ácido gálico (20-100 mg/100 mL) y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g muestra^{19,24}. El contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante fueron obtenidos a partir de extractos acetona: agua (70:30, v/v) de la Llayta, de modo que ellos representan la contribución de las moléculas solubilizadas en dichos extractos.

El perfil y la cuantificación de los aminoácidos de la Llayta se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Molecular, P. Universidad Católica de Chile, de acuerdo a protocolos preestablecidos de derivatización con 2-mercapto-o-ftaldehído y separación por HPLC con detector de fluorescencia, con excitación a 340 nm y emisión a 455 nm, usando estándares de aminoácidos Sigma-Aldrich^{25,26}.

Extracción de ADN y PCR

La cianobacteria *Nostoc* sp. Llayta (depositada en el Servicio de Cultivos Biológicos, Centro de Investigaciones Isla de la Cartuja, Sevilla, España) fue cultivada como se ha descrito previamente³. ADN genómico fue extraído usando el sistema Ultra Clean™ (MO BIO Lab Inc.), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El gen que codifica para microcistina sintetasa (*mcyE*) se amplificó por PCR usando los cebadores *mcyE*-F2 y *mcyE*-R4 descritos por Rantala et al.²⁷, en una mezcla de reacción de 50 µL que contenía 120 ng de ADN molde, 100 picomoles de cada de cebador, 1 µL de 10 mM dNTPs y 1 µL de 1U de polimerasa Taq (Invitrogen). El programa de PCR incluyó una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 s a 52 °C, 1 min a 72 °C y una etapa de extensión final de 7 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados

fueron clonados en un vector pGEM[®]-T easy (Promega) y usados para transformar *E. coli* DH5α. Las secuencias de los fragmentos amplificados se obtuvieron en Macrogen Inc., Corea. La búsqueda de identidad de secuencias con el gen *mcyE* se realizó utilizando el algoritmo BLASTn en el banco de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). ADN de *Salmonella enteritidis* (control negativo) y *Nostoc* sp. 152 (control positivo) fueron usados como controles de amplificación del gen *mcyE*. La cepa cianotóxica, productora de microcistina, *Nostoc* sp. 152, fue aislada de muestras lacustres en Finlandia y donada por la Dra. Kaarina Sivonen (Universidad de Helsinki).

RESULTADOS

Composición Bioquímica de la Llayta

Las proteínas totales, lípidos totales y cenizas representaron el 30%, 2% y 6% del peso seco de la Llayta, respectivamente, y los carbohidratos correspondieron al 61% de su peso seco (Tabla 1). Las evaluaciones en colonias frescas de *Nostoc*, colectadas en humedales peruanos registraron un contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos de 30-35%, 50% y 17%, respectivamente^{12,13}. El contenido de lípidos de las muestras comerciales de la Llayta y de la biomasa de cultivos de la cianobacteria *Nostoc* sp. Llayta, registraron valores de 2,4% y 12,1% del peso seco, respectivamente³.

Entre las vitaminas evaluadas en la biomasa de las colonias de la Llayta, sólo las vitaminas E y C fueron las más abundantes (4,3 y 0,7 mg%, respectivamente), siendo marginal el contenido de vitamina A y D3 (Tabla 1).

Tabla 1

Composición bioquímica parcial de la biomasa seca de Llayta. Los resultados son promedio de duplicados independientes, con tres réplicas cada uno.

Componente	Contenido en base seca (g/100 g p/p)
Proteínas totales	30,4
Lípidos totales	1,7
Carbohidratos totales	60,8
Cenizas	6,4
Aminoácidos totales	9,7
Ácidos grasos totales	1,4
Fibra dietética soluble	8,8
Fibra dietética insoluble	47,6
Vitamina E	4,3 mg % p/p
Vitamina C	0,7 mg % p/p
Vitamina A	< 0,5 ug/100 g
Vitamina D3	< 0,05 ug/100 g

Aminoácidos

Cerca de 44% de los aminoácidos encontrados en la Llayta correspondieron a los aminoácidos considerados como indispensables en humanos (Tabla 2)^{31,32}. Los aminoácidos esenciales más abundantes fueron valina, metionina, lisina y leucina, representando el 82% del total de los aminoácidos esenciales y un 36% del total de los aminoácidos de la Llayta. Cuatro aminoácidos, valina más arginina (indispensables) y serina más aspartato (dispensables) representaron el 52% del total de aminoácidos en Llayta (Tabla 2).

Los aminoácidos asparagina, glutamina, triptófano y prolina no fueron detectados por el sistema analítico usado para este estudio, lo que puede estar asociado a la inestabilidad química de algunos (por ejemplo; triptófano), a las derivatizaciones incompletas y a la degradación diferencial de otros a alta temperatura, previo a la separación cromatográfica y posterior cuantificación^{25,26}.

La distinción entre aminoácidos dispensables e indispensables está estrictamente relacionada con la dieta y algunos aminoácidos no-esenciales son considerados condicionalmente indispensables en circunstancias particulares; por ejemplo, en casos de una síntesis insuficiente durante estadios de crecimiento rápido y en algunas alteraciones metabólicas³¹⁻³³. Al considerar a arginina, tirosina y cisteína como aminoácidos condicionalmente indispensables, el contenido de aminoácidos esenciales de la Llayta aumenta al 60% del total de aminoácidos (Tablas 2 y 3).

Tabla 2

Contenido de aminoácidos en la biomasa seca de Llayta.

Aminoácido	Contenido (mg/g de biomasa seca)	Contenido** (mg/g de proteína total)
<i>Esenciales:</i>		
Histidina	40	1,3
Isoleucina	575	19,2
Leucina	793	26,4
Lisina	794	26,5
Metionina	805	26,8
Fenilalanina	157	5,2
Treonina	2	0,07
Valina	1.053	35,1
Cisteína*	16	0,5
Tirosina*	185	6,2
Arginina*	1.367	45,6
<i>No esenciales:</i>		
Alanina	250	8,3
Aspartato	1.387	46,2
Glicina	436	14,5
Glutamato	608	20,3
Serina	1.226	40,9

*esenciales bajo ciertas condiciones (33,38); **calculado en base a un contenido de 30% de proteínas totales en biomasa seca de la Llayta. Los aminoácidos triptófano, prolina, asparagina y glutamina no se detectaron.

Tabla 3

Composición aminoacídica de la biomasa de la Llayta y de valores referencia para la ingesta diaria recomendada de aminoácidos esenciales³⁸.

Aminoácido esencial	Contenido (mg/g proteína)**	Recomendación (mg/g proteína)
Histidina	1,3	15
Isoleucina	19,2	30
Leucina	26,4	59
Lisina	26,5	45
Metionina + Cisteína*	27,4	22
Fenilalanina + Tirosina*	11,4	38
Treonina	0,07	23
Triptófano	ND	6
Valina	35,1	39
Total de aminoácidos esenciales	147	277

*Esenciales bajo ciertas condiciones (33,38); **Calculado en base a un contenido de 30% de proteínas en la biomasa seca de la Llayta. ND: no detectado.

Ácidos grasos

El contenido de ácidos grasos (AG) totales fue el 1,4% del peso seco de la Llayta y representaron el 82% de la grasa total (Tablas 1 y 4). Los ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP) correspondieron al 32%, 35% y 33% del total de ácidos grasos, respectivamente. Los AG más abundantes en las categorías AGS, AGM y ASP, fueron ácido palmítico (24%), ácido oleico (18%) y ácido alfa-linolénico (27%), respectivamente, dando cuenta del 70% del total de AG en la biomasa de Llayta (Tabla 4).

Los ácidos omega-3, alfa-linolénico, y omega-6, alfa-linoleico, correspondieron a un tercio del total de AG, proporcionando un valioso valor nutritivo a la Llayta.

Carbohidratos y fibra

Los carbohidratos totales representaron el 61% del peso seco de la Llayta (Tabla 1). Esta alta acumulación se describió en especies del género *Nostoc* tolerantes a la desecación, en las que los polisacáridos, macromoléculas polares y ricas en grupos hidroxilos, inmovilizan las moléculas de agua líquida, disminuyendo su pérdida y favoreciendo la recuperación de la actividad metabólica y la reparación de daños, durante la rehidratación celular⁴⁴.

La fibra total representó el 56,4% del peso seco de Llayta (Tabla 1) y se compara apropiadamente con lo registrado en algas marinas comestibles y microalgas, cuyos contenidos promedios varían entre 20% y 60% de la masa seca^{7,30}. La relación fibra insoluble/soluble fue cercana a 5:1 y representa una relación similar a la de salvado de trigo y fue mayor a la encontrada en pan integral, legumbres, frutas y verduras⁴⁵.

Antioxidantes

En la Llayta, la actividad antioxidante total fue 17,4 micromoles equivalentes Trolox, con un contenido de polifenoles totales de 64 mg EAG, en base a 100 g de muestra seca (Tabla 1). Estos valores son similares a los encontrados en productos como piñones y luce¹⁸ y en cianobacterias, incluyendo a *Nostoc punctiforme*, con valores de 22,2 a 38,9 equivalentes Trolox por 100 g de masa húmeda⁴⁹.

Minerales

El contenido mineral de la biomasa de Llayta fue cercano al 6% del peso seco de las muestras obtenidas durante 201-2015, en el mercado de la ciudad de Arica (Tabla 1), con un orden de abundancia de $K^+ > Mg^{++} > Na^+ > Ca^{++}$ (Tabla 5). La relación Na^+/K^+ fue 0,46 y es tres veces superior a lo descrito para algas marinas de uso comestible³⁰.

El contenido promedio de arsénico total en las muestras de la Llayta obtenidas en Arica durante 2013-2016, fue de

$9,2 \pm 5,4$ ppm (Tabla 5); esta evidente variabilidad en el contenido de este metaloide en las muestras estudiadas se analizará más adelante.

Cianotoxinas

Este estudio demostró que el gen *mcyE* no estaba presente en el genoma de la cianobacteria (Figura 1, carril 2). *Salmonella enteritidis* es una bacteria filogenéticamente lejana al género *Nostoc* y no es productora de cianotoxinas, de modo que no posee el gen *mcyE* en su genoma (control negativo; Figura 1, carril 1). El genoma de *Nostoc sp.* 152 fue utilizado como control positivo y se demostró que posee el gen *mcyE* (Fig. 1, carril 3). La estirpe lacustre *Nostoc* 152 es productora de microcistina, fue aislada en Finlandia y se usó como un modelo de estudio para el género *Nostoc*. Adicionalmente, extractos de Llayta y de *Nostoc sp.* Llayta proporcionaron resultados negativos (datos no mostrados) en inmunoensayos ELISA diseñados para la detección de microcistina (Beacon Analytical Systems).

Tabla 4
Composición de ácidos grasos de la biomasa seca de la Llayta.

Composición	Contenido (mg/100 g biomasa seca)	Porcentaje del total de ácidos grasos
Ácidos grasos saturados:	438,5	32,0
Ácido tetradecanoico (C14:0)	38,9	2,9
Ácido palmítico (C16:0)	329,7	24,0
Ácido heptadecanoico (C17:0)	2,8	0,2
Ácido esteárico (C18:0)	42,2	3,1
Ácido eicosanoico (C20:0)	24,9	1,8
Ácidos grasos monoinsaturados:	479,9	35,0
Ácido palmitoleico (C16:1)	227,8	16,7
Ácido oleico (C18:1)	252,1	18,4
Ácidos grasos poliinsaturados:	449,6	33,0
Ácido alfa-linoleico (C18:2n6)	76,3	5,6
Ácido alfa-linolénico (C18:3n3)	373,2	27,3

Tabla 5

Composición y contenido mineral parcial de Llayta. Se muestra el promedio de siete determinaciones más la desviación estándar.

Elemento	Concentración (mg/100g p/p)
Potasio	3767 ± 950
Magnesio	3409 ± 250
Sodio	1738 ± 107
Calcio	1120 ± 262
Hierro	147 ± 0,2
Arsénico total	0,92 ± 0,54*
Cobre	1,4 ± 0,0

*Cinco muestras obtenidas durante 2013-2016.

Figura 1. Amplificación por PCR del gen *mcyE*. Los productos PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. Carril 1: *Salmonella enteritidis* (control negativo); carril 2: *Nostoc sp. Llayta*; carril 3: *Nostoc sp. 152* (control positivo). M: marcador molecular (1kb DNA ladder, Fermentas). La flecha indica la posición del fragmento de 800 bp (pares de bases) correspondiente a la amplificación del gen *mcyE* en el genoma de *Nostoc sp. 152*, estirpe productora de microcistina.

DISCUSIÓN

Las cianobacterias representantes de la familia *Nostocaceae* han sido usados en alimentación humana por generaciones, particularmente en Asia y Sudamérica^{3,4,28}. Recientemente, el consumo y sobreexplotación de la especie comestible *Nostoc flagelliforme* en China, ha llevado a implementar políticas gubernamentales de protección y conservación de su hábitat²⁸. En la región andina chilena, *Nostoc sp. Llayta* crece naturalmente en humedales andinos y sus colonias están presentes en el Parque Nacional Lauca, Río Caquena, Lago Chungará, Lagunas de Cotacotani, Salar de Huasco, Turi, Río Grande y Machuca, a lo largo de un corredor andino de cerca de 500 km de longitud.

Luego de ser cosechadas en su lugar de origen, las colonias secas de la cianobacteria *Nostoc sp. Llayta* son almacenadas y comercializadas como Llayta en Tacna, en el sur de Perú, y en Arica e Iquique, en el norte de Chile. Esta práctica alimentaria andina precolombina^{1-3,12,13} está desapareciendo, particularmente en zonas urbanas del norte de Chile y sur de Perú.

La desecación al sol y el tiempo de almacenaje a la que son sometidas las colonias de *Nostoc* que se comercializan en Arica, pueden ser considerados como dos factores físicos que favorecerían procesos de oxidación, hidrólisis y degradación de los lípidos, y explicaría el menor contenido de ellos en las colonias de la Llayta, en comparación a los contenidos encontrados en las muestras frescas de colonias y en la biomasa cultivada^{3,12,13}.

Aun cuando el contenido de la vitamina E es comparativamente más bajo que el de otros alimentos (por ejemplo, 4,9 mg de vitamina E por 10 g de aceite de girasol) y que el aporte diario recomendado de esta vitamina es cercano 15 mg/día para adultos, se puede concluir que la

Llayta sólo contribuye parcialmente al aporte recomendado para esta vitamina²⁹.

Por otro lado, los contenidos de proteínas, fibra dietética total, lípidos y minerales de Llayta son similares a los descritos en algas marinas comestibles³⁰.

Las carnes de origen animal poseen un contenido promedio de proteína total cercano al 20%; entre ellas, la carne de pescado, considerada un alimento con alta calidad proteica, posee un contenido de aminoácidos esenciales de 340 mg/g proteína y un contenido de colágeno menor al de la carne de vacuno, lo que la hace más digerible³⁴⁻³⁶. Los contenidos de los aminoácidos esenciales isoleucina, leucina, lisina presentes en la Llayta son comparables a los descritos para la leche entera en polvo³⁷. El aminoácido lisina es limitante en alimentos como cereales y trigo y, en la Llayta, este aminoácido está presente a una concentración de 26,5 mg por gramo de proteína.

Los aminoácidos azufrados, escasos en legumbres, son abundantes en las proteínas de cereales y animales³⁸ y la proteína de la Llayta contribuye con un contenido de metionina cercano a cinco veces superior al encontrado en la leche y en pescados³⁴. La recomendación de ingesta diaria para adultos de los aminoácidos esenciales lisina, metionina más cisteína, valina y triptófano es de 30, 15, 26 y 4 mg/kg/día, respectivamente³⁸. Con la excepción de los aminoácidos esenciales triptófano, treonina e histidina, esta recomendación puede ser cubierta parcialmente con la incorporación de la Llayta en una dieta equilibrada, al contribuir con un contenido de proteínas totales cercano al 30% de su peso seco y cerca de 147 mg de aminoácidos esenciales por gramo de proteína (Tabla 3). La WHO-FAO-UNU³⁸ recomienda una ingesta diaria de aminoácidos esenciales de 277 mg/g de proteína. La proteína de la Llayta

contribuiría con cerca del 50% de este requerimiento (Tabla 3).

A la fecha, no existen estudios sobre la biodigestibilidad, la biodisponibilidad y el índice de aminoácidos indispensables digeribles de las proteínas y de otros nutrientes de la Llayta, por lo que es un trabajo pendiente de alta importancia.

La identificación del ácido alfa-linolénico (C18:3n3) en la biomasa de cultivos de *Nostoc* sp. Llayta, en *Nostoc flagelliforme* y en otras cianobacterias del género *Nostoc* es consistente con la presencia y contenido de este AGP en la biomasa de las colonias de la Llayta³⁹⁻⁴¹. La composición de ácidos grasos de microalgas y cianobacterias es altamente variable observándose marcadas diferencias dentro de un mismo género³⁹. El ácido graso omega-3 es un metabolito de importancia nutricional y su consumo, junto a otras fuentes de AGP (aceites de girasol, oliva, soya, chía, canola), es recomendado para el control y prevención de los niveles de colesterol y enfermedades cardiovasculares^{8,42}. Adicionalmente, el contenido de ácido palmitoleico, un omega-7, fue cercano al 17% del total de los ácidos grasos en la Llayta y ha sido propuesto como un mediador de acción antiinflamatoria⁴³.

En este trabajo, la presencia de AGP de cadena larga, del tipo ácidos gama-linolénico y eicosapentaenoico, no fue detectada en Llayta, ni tampoco se han registrado en la biomasa cultivada de la cianobacteria *Nostoc* sp. Llayta⁴⁰. Es razonable concluir que esta estirpe de cianobacteria no poseería la capacidad genética para la síntesis de este tipo de ácidos grasos o que se requiere de condiciones de cultivo específicas para optimizar su biosíntesis. Evidentemente, la Llayta contiene una amplia gama de ácidos grasos con diversos grados de insaturaciones e importancia nutricional; sin embargo, el impacto nutritivo de este ingrediente se ve disminuido debido al bajo porcentaje de lípidos totales de la biomasa seca.

Esta es la primera aproximación al estudio de la fibra dietética presente en la biomasa de la Llayta, por lo que no existen estudios sobre la composición química de la fibra soluble e insoluble. Los polisacáridos hidrosolubles extraídos de colonias comestibles del género *Nostoc* están constituidos de manosa, galactosa, ácido glucurónico, xilosa, glucosa, ramnosa y fucosa, en diferentes proporciones, según la especie en estudio⁴⁶.

Una ingesta diaria de fibra dietética, en una relación de fibra insoluble (celulosa, lignina y otros) a fibra soluble (pectina) de 3:1, favorece los procesos digestivos y disminuiría los riesgos de diabetes, hipertensión y enfermedades cardíacas^{45,47}. Complementariamente, polisacáridos de la microalga verde *Chlorella* inducen un efecto modulador de la respuesta inmune en macrófagos *in vitro*, en tanto que el consumo de fibra de *Nostoc commune* se asocia a la disminución de colesterol plasmático en roedores⁴⁸. En consecuencia, el consumo de la Llayta proporciona un alto contenido de fibra total y un probable beneficio a la salud del consumidor.

Los niveles de polifenoles totales en la Llayta son intermedios a los publicados para extractos acuosos y

orgánicos de algas, de <1 a 300 mg EGA por 100 g de alga seca³⁰. Tanto el contenido de los polifenoles totales y su contribución a la capacidad antioxidante de la Llayta estarían siendo subestimados al representar solamente a la fracción extraíble desde la biomasa, sin considerar la fracción de polifenoles unidos por interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes a la fibra u otro componente celular^{50,51}. Las ficobiliproteínas representan cerca del 30% del peso seco de la biomasa de *Nostoc* sp. Llayta cultivada³ y poseen una capacidad antioxidante comparable a la vitamina E y la melatonina⁵². La vitamina E es la más abundante en la Llayta (4,3 mg%), es considerada clave en la defensa celular al daño oxidativo, se obtiene exclusivamente de la dieta y protege AGS y otros componentes celulares de la acción de radicales libres⁵³. Por ello, el consumo de la Llayta proveería parte de los antioxidantes requeridos en la dieta humana.

El contenido de minerales de un microorganismo depende de la composición química del medio natural o artificial de crecimiento, de modo que los contenidos registrados en las colonias de la Llayta son una consecuencia de la química de los humedales en que se cosecharon las colonias. Una dieta pobre en potasio contribuye con cerca de 400-600 mg K⁺/día; en cambio, una dieta normal occidental proporciona 1.600-4.700 mg K⁺/día. Sin embargo, la relación K⁺/Na⁺ de una dieta debe alcanzar valores cercanos a 10 para ser un factor que contribuya a disminuir los riesgos de hipertensión arterial e infartos cerebrales⁵⁴. La relación K⁺/Na⁺ en la Llayta es cercana a 2 pero su contribución de potasio es marginal si se considera que un gramo de la Llayta proporciona cerca de 40 mg K⁺. Comparativamente, la Llayta supera ampliamente el contenido de K⁺ registrado en frutas y verduras de consumo regular; por ejemplo, en 2-3 veces el contenido de chuño y pistachos y en más de 10 veces al contenido de K⁺ en el plátano⁵⁴. Así, la incorporación de la Llayta en una dieta tradicional rica en sodio contribuye parcialmente a mejorar el déficit de potasio y a disminuir en parte el riesgo de desarrollar la hipertensión arterial, asociada a dietas con una alta relación Na⁺/K⁺.

En una perspectiva biotecnológica, el cultivo bajo condiciones controladas de la cianobacteria *Nostoc* sp. Llayta, productora de las colonias, permitiría modular los contenidos de minerales y metaloides en la biomasa e incrementar algunos de interés nutricional, como el hierro.

Representantes de los géneros *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* y *Haematococcus* son ejemplo de microalgas usadas en la producción de moléculas bioactivas de interés nutricional⁷. La visión de que la Llayta sea un recurso ancestral nutritivo es favorecida porque sus contenidos de proteínas, lípidos, carbohidratos, aminoácidos esenciales y ácidos grasos insaturados, se encuentran dentro de los niveles registrados para la cianobacteria *Spirulina* y la microalga unicelular *Chlorella*^{7,39,55}.

La versátil capacidad metabólica de las cianobacterias les permite producir una amplia variedad de metabolitos secundarios y, entre ellos, algunos que poseen efectos nocivos a la salud humana y animal. La biosíntesis de estos y otros

metabolitos depende de la especie, de las adaptaciones fisiológicas del organismo a medioambientes diferentes y a las condiciones de cultivo. Consecuentemente, la producción de biomasa de cianobacterias, su incorporación como ingrediente en productos alimenticios y su eventual comercialización deben asegurar la ausencia de compuestos tóxicos (6). Arsénico y dos compuestos orgánicos bioactivos son pertinentes de mencionar a continuación.

Primero. BMAA (β-N-metilamino-L-alanina) es un aminoácido no-proteico y neurotóxico descrito en la década de los cincuenta y que está presente en cianobacterias^{56,57}. Por ejemplo, un amplio rango de concentraciones de BMAA (0,05 a 2.755 ug/g) fueron detectados en el 96% de las cianobacterias aisladas de fuentes de agua dulce en Sudáfrica⁵⁸. También, niveles promedios de 10 ug BMAA/g fueron encontrados en muestras de *Nostoc commune*, comercializado en mercados de Cuzco, Perú⁵⁹. La ausencia de estudios y evidencias epidemiológicas no han permitido confirmar una correlación entre la ingesta de estas cianobacterias y daños neurodegenerativos en la población. Además, la relación causal entre la ingesta de la neurotoxina BMAA y la esclerosis lateral amiotrófica junto al complejo Parkinson-Demencia, sigue siendo considerada como una hipótesis controvertida, que requiere de evidencias etiológicas complementarias⁵⁷. Evidentemente, la demostración de la presencia y contenido de BMAA en Llayta, o en *Nostoc sp. Llayta*, es un importante trabajo pendiente.

Segundo. Miembros de los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* y *Nostoc* aislados de floraciones planctónicas, de reservorios de agua y de cianolíquenes, acumulan heptapéptidos cíclicos hepatotóxicos del tipo microcistina^{27,59}. La biosíntesis no-ribosomal de microcistina requiere de la expresión de un agrupamiento de genes, entre ellos, el gen *mcyE*; este último es usado ampliamente como un marcador genético para identificar y evaluar la toxicidad de diversas estirpes de cianobacterias^{27,60}. La eventual potencialidad de la Llayta para sintetizar y acumular microcistina fue estudiada en la constitución nucleotídica del ADN de *Nostoc sp. Llayta*. Nuestro estudio demostró que el gen *mcyE* no está presente en el genoma de la cianobacteria.

Tercero. Un contenido promedio de arsénico total de 0,92±0,54 mg% se registró en muestras de la Llayta obtenidas durante 2013-2016 (Tabla 5), y en un registro anterior, el contenido de As total en la Llayta fue 3,4 mg% (3). La alta variabilidad observada en el contenido de As en la Llayta está probablemente relacionada con la diversidad de humedales andinos en los que se colectan las colonias, de los contenidos de arsénico de dichos sitios y la época de la colecta; la incerteza acerca de los sitios y época de colección de las colonias de Llayta fue confirmada en conversaciones con vendedores de la Llayta en el mercado hortofrutícola de Arica.

La presencia de arsénico en productos alimenticios del territorio norte chileno es un hecho recurrente y necesario

de evaluar constantemente. Por ejemplo, organismos bentónicos marinos de la costa chilena acumulan entre 0,1 a 20 mg% de arsénico⁶¹. Comparativamente, un bajo nivel de As total de entre 0,01-0,60 ug As/g peso húmedo fue informado para diversos vegetales cultivados para consumo humano en la Región de Antofagasta, Chile, siendo arsénico inorgánico la especie más abundante⁶².

Muestras comerciales de *Nostoc flagelliforme* consumidas en China poseen un contenido de arsénico de 3 ppm, tres veces inferior al obtenido en la Llayta⁶³. La especie más abundante es un arsenozúcar (ribósido con arsénico metilado), una molécula que sería parte del mecanismo de detoxificación de arsénico y que puede originar derivados metabólicos metilados de ácido arsínico, potencialmente carcinogénicos⁶³. En España, algas marinas secas para consumo humano presentan contenidos de arsénico entre 0,2 a 14 mg% de As total. El arsénico de la biomasa seca de *Nostoc spp.* ("black moss") fue 3,35 mg% As, predominantemente como arsenozúcares⁶⁴.

Según la legislación vigente en Chile⁶⁵, los productos sólidos para consumo humano no deben superar el nivel de 0,1 mg% de As, por lo que el contenido de la Llayta es en promedio, nueve veces superior a la norma chilena. Comparativamente, diversos productos vegetales producidos en la Región de Antofagasta no exceden los niveles indicados por la norma chilena⁶². A partir del año 1989, WHO/FAO definió un nivel de 0,015 mg de arsénico inorgánico por kilo de peso corporal como consumo semanal tolerable provisional (PTWI); sin embargo, este índice fue reevaluado y ya no es un nivel vigente⁶⁶.

En base a diálogos con vendedores y consumidores de la Llayta en Arica, se logró conocer que este ingrediente es usado sin hervirlo previamente y que el consumo familiar promedio máximo de Llayta sería cercano a 5 g por semana. Esto implica que el contenido total de arsénico en Llayta permanece en la preparación alimenticia, por lo que no es recomendable el consumo de grandes cantidades de este producto natural.

La ausencia de evidencias toxicológicas, el consumo ancestral, la cantidad promedio consumida y la composición química informada en este trabajo, son antecedentes que indican que la Llayta sería un ingrediente seguro con aportaciones nutritivas complementarias a una dieta equilibrada; sin embargo, la especiación de arsénico y la evaluación de la presencia de BMAA son tareas pendientes.

CONCLUSIONES

El recurso Llayta es un ingrediente ancestral en la práctica alimentaria de las comunidades andinas de Sudamérica, que actualmente sigue vigente en la cocina rural y urbana en el sur de Perú y parte del norte de Chile, pero con riesgo de desaparecer por desconocimiento de sus propiedades nutritivas y por los cambios culturales en la alimentación.

La ingesta promedio de la Llayta por la población es baja y es razonable evitar su consumo en grandes cantidades, dado su contenido de arsénico total. La Llayta acumula

arsénico en concentraciones variables, probablemente debido a que el producto disponible en el mercado no tiene un origen en común. Para evaluar su potencial toxicidad, es necesario implementar estudios que permitan identificar y cuantificar a las especies inorgánicas y orgánicas de arsénico en la Llayta.

La cianobacteria *Nostoc sp.* Llayta, formadora de macrocolonias en humedales alto-andinos, no acumula la cianotoxina microcistina ya que su genoma no posee el gen *mycE*, cuya expresión es clave para la biosíntesis de esta molécula. Esto permite descartar la presencia de cianotoxinas del tipo microcistina en las colonias de la Llayta.

No se dispone de información acerca de la presencia de compuestos potencialmente tóxicos como BMAA en las colonias de la Llayta; por tanto, es necesario evaluar el eventual contenido de BMAA en la Llayta. Con el propósito de avanzar en la evaluación toxicológica de la Llayta y su cianobacteria, la presencia de los genes requeridos para la biosíntesis de BMAA puede ser estudiada mediante aproximaciones genómicas y bioinformáticas en el ADN de *Nostoc sp.* Llayta, lo que proporcionaría valiosos antecedentes sobre la capacidad de la cianobacteria *Nostoc sp.* Llayta para sintetizar BMAA u otras moléculas potencialmente tóxicas.

Las evidencias disponibles, esto es, los siglos de consumo ancestral de la Llayta, la ausencia de evidencias epidemiológicas y una composición bioquímica con un alto contenido en aminoácidos esenciales, ácidos grasos insaturados, fibra y polifenoles, indican que la Llayta es un ingrediente que contribuye a la nutrición del consumidor.

Finalmente, y como una proyección biotecnológica de este estudio, es razonable considerar que el cultivo masivo de la cianobacteria productora de colonias, *Nostoc sp.* Llayta bajo condiciones controladas, proporcionará una biomasa libre de arsénico y ser un valioso componente en la formulación de nuevos productos de interés alimenticio, proporcionando valor agregado y revitalizando el consumo de este recurso hidrobiológico andino.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado parcialmente por la Universidad de Antofagasta (proyectos SI-5305 y CODEI-5394) y CONICYT, Chile (proyecto CeBiB FB-0001). Agradecemos a la Dra. K. Sivonen, Finlandia, por la gentil donación de la estirpe Nostoc sp.152. Reconocemos los esfuerzos, entusiasmo y el apoyo brindado por nuestro colega, Profesor Héctor Olivares Núñez (1958-2016), en este y otros trabajos de nuestro grupo. Fueron muchos años en que compartimos el interés por la Microbiología del Norte de Chile y sus cianobacterias en particular, recursos biológicos de insospechados beneficios y sorpresas científicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bertonio L. Aymara Vocabulary. University of Wisconsin, Madison. [Internet]. 1612. Available from: <http://kuprienko.info/ludovico-bertonio-vocabulario-de-la-lengua-aymara-1612/52/>
- Lagerheim, MG. La Yuyucha. La Nuova Notarisia 1892; 3: 1376-1377.
- Gómez-Silva B, Mendizabal I, Tapia I, Olivares H. Microalgae from northern Chile. IV. Chemical composition of *Nostoc commune* Llayta. Rev Invest Cient Tecnol Cs del Mar 1994; 3: 19-25.
- Becker EW. Microalgae for human and animal consumption. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ. ed. Microalgal Biotechnology. Cambridge, UK, Cambridge: University Press 1998; 257-287.
- Gantar M, Svircev Z. Microalgae and cyanobacteria: food for thought. J Phycol 2008; 44: 260-268.
- Niccolai A, Bigagli E, Biondi N, Rodolfi L, Cinci L, Luceri C, Tredecini MR. In vitro toxicity of microalgal and cyanobacteria strains of interest as food sources. J Appl Phycol. 2017; 29: 199-209.
- Chacón-Lee TL, González-Mariño GE. Microalgae for "healthy" foods - Possibilities and challenges. Compr Rev Food Sci Food Saf 2010; 9: 655-675.
- Valenzuela A, Sanhueza J, Valenzuela R. Microalgae: renewable source for long chain omega-3 fatty acids for human and animal nutrition. Rev Chil Nutr 2015; 42: 306-310.
- Gómez-Silva B. On the Limits Imposed to Life by the Hyperarid Atacama Desert in Northern Chile. In: Basiuk VA, ed. Astrobiology: Emergence, Search and Detection of Life. Los Angeles, CA: American Scientific Publishers USA; 2010. 199-213.
- Bull AT, Asenjo JA, Goodfellow M, Gómez-Silva B. The Atacama Desert: technical resources and the growing importance of novel microbial diversity. Annu Rev Microbiol 2016; 70: 215-234.
- Pardo O, Pizarro JL. Chile: Pre-Hispanic Edible Plants. Ediciones Parina. Arica, Chile; 2003.
- Aldave-Pajares A. Cuschuro, blue-green algae used as food at the peruvian Andes highland región. Bol Soc Bot Libertad 1969; 1: 9-22.
- Aldave-Pajares A. Andean algae from Peru as a hydrobiological food resource. Bol Lima 1985; 7: 66-72.
- Villagrán C, Castro V, Sánchez G, Hinojosa F, Latorre C. The Altiplano tradition: ethnobotanic study at the Iquique Andes, I Region, Chile. Chungara 1999; 31: 81-186.
- Vitek P, Jehlicka J, Ascaso C, Masek V, Gómez-Silva B, Olivares H, Wierzechos J. Distribution of scytonemin in endolithic microbial communities from halite crusts in the hyperarid zone of the Atacama Desert, Chile. FEMS Microbiol Ecol 2014; 90: 351-366.
- Schmidt-Hebbel H. Advances in Food Science and Technology. Santiago Chile: Alfabeta; 1981.
- Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC. 15th ed. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists; 1990.
- INTA (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos) [Internet]. 2015. Available from: <http://www.dinta.cl/servicios/analisis-de-alimentos/>
- Wu X, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior R. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. J Agric Food Chem 2004; 52: 4026-4037.
- AOCS. Official method Ce-1b-89, Fatty acid composition by GLC: Marine oils. Champaign IL: 1992.
- Association of Official methods of analysis of the AOAC. Official Method 991.43. Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods Annex G [Internet]. 1995. Available from: https://acnfp.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/annexg.pdf
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS

- Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26 (9/10): 1231-1237.
23. Speisky H, Rocco C, Carrasco C, Lissi E, López Alarcón C. Antioxidant screening of medicinal herbal teas. *Phytother Res* 2006; 20: 462-467.
24. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. In: *Methods in Enzymology* 299 (Oxidants and Antioxidants, Part A). San Diego, CA: Academic Press; 1999; 152-178.
25. Hawkins CL, Morgan PE, Davies MJ. Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 965-988.
26. Polo MC, Ramos M, González de Llano D. HPLC of Peptides. In: *Nollet LML. Food analysis by HPLC. Second Edition*. New York: Marcel Dekker Inc; 2000; 127-168.
27. Rantala A, Rajaniemi-Wacklin P, Yra CL, Lepistö L, Rintala J, Mankiewicz J, Sivonen K. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene *E* (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 6101-6110.
28. Qiu B, Liu J, Liu Z, Liu S. Distribution and ecology of the edible cyanobacterium *Ge-Xian-Mi* (*Nostoc*) in rice fields of Hefeng County in China. *J Appl Phycol* 2002; 14: 423-429.
29. Carbajal A. Manual de Nutrición y Dietética. Universidad Complutense de Madrid [Internet]. 2013. Available from: <https://www.ucm.es/nutricioncarbajal/manual-de-nutricion>
30. Quiral V, Morales C, Sepúlveda M, Schwartz M. Nutritional and health properties of seaweeds and its potential as a functional ingredient. *Rev Chil Nutr* 2012; 39: 196-202.
31. Visek WJ. An update of concepts of essential amino acids. *Annu Rev Nutr* 1984; 4: 137-155.
32. Pencharz PB, Ball RO. Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annu Rev Nutr* 2003; 23: 1001-1006.
33. Elango R, Ball RO, Pencharz PB. Amino acid requirements in humans: with a special emphasis on the metabolic availability of amino acids. *Amino Acids* 2009; 37: 19-27.
34. Izquierdo P, Torres G, Allara M, Márquez E, Barboza Y, Sánchez E. Análisis proximal, contenido de aminoácidos esenciales y relación calcio/fósforo en algunas especies de pescado. *Revista Científica FCV-LUZ* 2001; 11(2): 95-100.
35. Acuña-Reyes MJ. Peces de cultivo, composición, comparación con carnes de consume habitual. Ventajas del consumo de pescado. *Comunicación Breve. Dieta* 2013; 31(143): 26-30.
36. Windsor ML. Fish Meal. FAO Corporate Document Repository [Internet]. 2011. Available from: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5926e/x5926e00.htm>
37. Lum, K, Kim J and Lei G. Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. *J Anim Sci Biotechnol* 2013; 4(53): 1-7.
38. WHO/FAO/UNU. Protein and amino acid requirements in human nutrition. WHO Technical Report Series 935. Geneva: WHO; 2007.
39. Wells ML, Potin P, Craigie JS, Raven JA, Merchannr SS, Helliwell KE, Smith AG, Camire ME, Brawley SH. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J Appl Phycol* 2017; 29: 949-982.
40. Vargas MA, Rodríguez H, Moreno J, Olivares H, Del Campo JA, Rivas J, Guerrero MG. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *J Phycol* 1998; 34: 812-817.
41. Lui XJ, Jiang Y, Chen F. Fatty acid profile of the edible filamentous cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* at different temperatures and developmental stages in liquid suspension culture. *Process Biochem* 2005; 40: 371-377.
42. Connor W. α -linolenic acid in health and disease. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 827-828.
43. Bueno-Hernández N, Sixtos-Alonso MS, Milke García MP, Yamamoto-Furusho JK. Effect of Cis-palmitoleic acid supplementation on inflammation and expression of HNF4 α , HNF4 γ and IL6 in patients with ulcerative colitis. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2017; 63: 257-63.
44. Potts M. Desiccation tolerance: a simple process?. *Trends Microbiol* 2001; 11: 553-559.
45. Pak N. Dietary fiber for human consumption and its importance in health. *Anales de la Universidad de Chile*. 2000; Primera Serie, N° 11.
46. Huang Z, Liu Y, Paulsen BS, Klaveness D. Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with different colony morphologies: comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. *J Phycol* 1998; 34: 962-968.
47. Gray J. Dietary Fiber: Definition, Analysis, Physiology and Health. Brussels: ILSI Europe Concise Monograph Series; 2006.
48. Rasmussen HE, Blobaum KR, Jesch ED, Ku CS, Park Y-K, Lu F, Carr TP, Lee J-Y. Hypocholesterolemic effect of *Nostoc commune* var. *sphaeroides* Kützinger, and edible blue-green alga. *Eur J Nutr* 2009; 48: 387-394.
49. Assuncao MFG, Amaral R, Martins CB, Ferreira JD, Ressureicao S, Dias Santos S, Varejao JMTB, Santos LMA. Screening microalgae as potential sources of antioxidants. *J Appl Phycol* 2017; 29: 865-877.
50. Saura-Calixto F, Diaz-Rubio ME. Polyphenols associated with dietary fibre in wine: A wine polyphenols gap? *Food Res Int* 2007; 40(5): 613-619.
51. Quirós Saucedo AE, Palafox H, Robles Sánchez RM, González Aguilar GA. Interacción de compuestos fenólicos y fibra dietaria: capacidad antioxidante y biodisponibilidad. *Biotechnia* 2011; 13(3): 3-11.
52. Romay CH, González R, Ledón N, Ramirez D, Rimbau V. C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr Protein Pept Sci* 2003; 4: 207-216.
53. Kadoma Y, Ishihara M, Okada N, Fujisawa S. Free radical interaction between vitamin E (α -, β - and δ -tocopherol), ascorbate and flavonoids. *In Vivo* 2006; 20: 823-828.
54. Zárate LH, Achondo MC. Rol protector del potasio. In: Zárate LH, editor. *Sodio & Potasio. En busca del equilibrio*. Santiago: Editorial; 2007; 22-28.
55. Buono S, Langelotti AL, Martello A, Rinna F, Fogliano V. Functional ingredients from microalgae, *Food Funct* 2014; 5: 1669-1685.
56. Monteiro M, Costa M, Moreira C, Vasconcelos VM, Baptista MS. Screening of BMAA-producing cyanobacteria in cultured isolates and in situ blooms. *J Appl Phycol* 2017; 29: 879-888.
57. Vardan TK, Speth RC. Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci* 2008; 82: 233-246.
58. Esterhuizen M, Downing TG. Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotox Env Safety* 2008; 71: 309-313.
59. Johnson HE, King SR, Banack SA, Webster C, Callanaupa WJ, Cox PA. Cyanobacteria (*Nostoc commune*) used as a

- dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA. *J Ethnopharmacol* 2008; 118: 159-165.
60. Genuário DB, Silva-Stenico ME, Welker M, Beraldo Moraes LA, Fiore MF. Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of *Nostoc*. *Toxicon* 2010; 55: 846-854.
 61. Díaz O, Encina F, Recabarren E, Del Valle S, Pastene R, Montes S, Figueroa A. Study on the concentration of arsenic, mercury, lead and phenanthrene in the clam *M. donacium*. Alimentary and toxicological implications. *Rev Chil Nutr* 2008; 35: 53-60.
 62. Muñoz O, Díaz OP, Leyton I, Nuñez N, Devesa V, Suárez MA, Velez D, Montoro R. Vegetables collected in the cultivated Andean area of northern Chile: total and inorganic arsenic contents in raw vegetables. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 642-647.
 63. Lai VW-M, Cullen WR, Harrington CF, Reamer KJ. The characterization of arsenosugars in commercially available algal products including *Nostoc* species of terrestrial origin. *Appl Organomet Chem* 1997; 11: 797-803.
 64. Farré Rovira R, Cacho Palomar JF, Cameán Fernández AM, Más Barón A, Delgado Cobos P. Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) related to the risk assessment associated to the possible presence of arsenic in algae intended to human consumption. *Rev Com Sci AESAN* 2009; 10: 53-71.
 65. Diario Oficial de la República de Chile. Decreto 977. Sanitary Rules for Food Products, Title IV, About Contaminants, Paragraph I, On Heavy Metals. Article 160, Arsenic; 1997.
 66. FAO - WHO. Evaluation of certain contaminants in food. Food Additive Series: 63. FAO JECFA Monographs 8. Geneva and Rome: 2011.