

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Caracterización físico-química y nutricional de algas en polvo empleadas como ingrediente alimentario

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: Jagla-Teresa Palasí Mascarós

TUTORA: Isabel Fernández Segovia

COTUTORA: Ana Fuentes López

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2015

TÍTULO:

Caracterización físico-química y nutricional de algas en polvo empleadas como ingrediente alimentario.

RESUMEN

Las algas se han consumido desde tiempos ancestrales en países asiáticos como Japón. En la actualidad su consumo está en auge en Europa, provocado por el creciente interés de los consumidores por alimentos con alto valor nutritivo, que sean saludables y sin aditivos químicos. En este sentido, el empleo de algas en el desarrollo de nuevos productos es interesante, ya que éstas pueden aportar nutrientes esenciales y además, algunas de ellas, presentan ciertas características que permitirían sustituir algunos aditivos en los productos elaborados. Dado el origen marino de las algas es muy interesante su adición a productos derivados de la pesca.

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar las algas nori, kombu, wakame y espagueti de mar, con el fin de evaluar si su empleo como ingrediente en distintos productos alimenticios, supondría una mejora en la calidad nutricional y en las propiedades físico-químicas de los mismos. Se llevó a cabo un análisis de la composición nutricional de las algas deshidratadas en polvo. Así mismo, se evaluó el contenido en compuestos fenólicos totales, la capacidad antioxidante y se determinó la capacidad de retención de aceite, capacidad de retención de agua y capacidad de hinchamiento.

Las algas presentaron altos contenidos proteicos, especialmente nori y wakame, con niveles superiores al 20% en peso seco (p.s.), presentando en su composición distintos aminoácidos esenciales y otros considerados potenciadores del sabor (ácido aspártico y glutámico). Los contenidos en lípidos fueron muy bajos en todas las algas. El contenido en cenizas fue alto (variando entre un 24 y un 34 % (p.s.)), lo que indica la riqueza en minerales de las algas. En general, las 4 algas presentaron valores altos de Na, K, Ca y Mg. Dado que el K aporta sabor salado y que las algas presentan aminoácidos potenciadores del sabor, el empleo de algas podría evitar o disminuir la adición de sal a los productos de la pesca. El contenido en fibra fue muy alto en las 4 muestras, destacando kombu con un valor cercano al 45% (p.s.).

Las 4 algas presentaron contenidos altos de compuestos fenólicos totales, destacando espagueti de mar. De igual forma, la capacidad antioxidante en esta especie de alga fue significativamente mayor que en el resto. Las 4 algas presentaron propiedades importantes de retención de aceite y de agua, destacando el alga wakame, que también presentó la mayor capacidad de hinchamiento.

Estos resultados demuestran que la incorporación de las algas en los productos de la pesca implicaría un valor añadido en el pescado, ya que no se vería reducido el contenido proteico, aportando minerales y fibra. Asimismo, la incorporación de estas algas permitiría evitar el uso de aditivos químicos, ya que éstas son una fuente natural de antioxidantes. Además, sus propiedades tecnológicas hacen que las algas puedan sustituir a algunos aditivos químicos empleados para mejorar la textura y jugosidad.

PALABRAS CLAVE:

Algas, nori, kombu, wakame, espagueti de mar, composición nutricional, capacidad antioxidante, propiedades tecnológicas.

AUTORA: D. Jagla-Teresa Palasí Mascarós

TUTORA: Dña. Isabel Fernández Segovia

CO-TUTORA: Dña. Ana Fuentes López

Valencia, Septiembre 2015

TITLE:

Physico-chemical and nutritional characterization of seaweed powder used as a food ingredient.

ABSTRACT

Seaweeds had been used since ancient times in Asian countries like Japan. Nowadays, consumption is rising in Europe. The reason is due to consumers are interested in food with high nutritional value and without chemical additives. In this sense, it is interesting the use of seaweed, which provides essential nutrients, to develop new food products; moreover, some of them have certain characteristics that allow replacing some additives in the products formulated. Given the origin marine of seaweeds is very interesting to add in fishing products.

The overall objective of this study was to characterize nori, kombu, wakame, and sea spaghetti, in order to assess their use as an ingredient in food products in order to increase the nutritional quality and improve physico-chemical properties. Nutritional composition of dehydrated powder seaweed was determined. Moreover, total phenolic compounds content and antioxidant capacity were assessed and water retention capacity, oil retention capacity and swelling capacity were determined.

The seaweeds exhibited high protein content, especially nori and wakame, with over 20% dry weight (dw) levels, containing different essential amino acids and other considered as flavor enhancers (aspartic and glutamic acid). The lipid levels were very low in all seaweeds. The ash content was high (varying between 24 and 34% (dw)), indicating the mineral wealth of seaweeds. In general, 4 seaweeds showed high Na, K, Ca and Mg levels. Due to K contributes salty taste and seaweeds amino acids act as flavor enhancers, the use of seaweeds could avoid or reduce the addition of salt to fish products. The fiber content was very high in the 4 samples, highlighting kombu with a value close to 45% (dw).

The 4 seaweeds showed high levels of total phenolic compounds, mainly spaghetti sea. Similarly, the antioxidant capacity in this species of seaweed was significantly higher than the rest. The four seaweed showed significant oil and water retention properties, specially wakame seaweed, which exhibited the highest swelling capacity.

These results demonstrate that the incorporation of seaweeds in fish products would imply an added value in fish since their protein content would not be reduced, providing minerals and fiber. Additionally, the incorporation of these seaweeds could avoid the use of chemical additives, as they could be a natural source of antioxidants. In addition, their technological properties would imply that seaweeds could replace some the chemical additives used to improve food texture and juiciness.

KEY WORDS:

Seaweeds, nori, kombu, wakame, spaghetti sea, nutritional composition, antioxidant capacity, technological properties.

AGRADECIMIENTOS:

A mi tutora, Isabel Fernández, porque su esfuerzo no puede describirse con palabras. A mi co-tutora, Ana Fuentes, por vivir en el laboratorio y poder contar siempre con ella. A mi familia y sobre todo a Marc por su paciencia y tolerancia. A todos mis compañeros (amigos) de laboratorio que han conseguido que disfrute llevando a cabo esta experiencia porque al final “La paciencia es la madre de todas las ciencias”.

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto “Desarrollo de productos saludables de pescado y algas: eficacia y aceptación - SaPesAl” (UPV-FE-2014-55), financiado por la Universitat Politècnica de València, a la que los autores quieren expresar su agradecimiento.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LAS ALGAS.....	1
1.2. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LAS ALGAS.....	2
1.2.1. Fibra alimentaria.....	2
1.2.2. Proteínas.....	3
1.2.3. Grasas.....	4
1.2.4. Cenizas.....	5
1.3. COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS ALGAS.....	5
1.3.1. Compuestos fenólicos.....	5
1.3.2. Capacidad antioxidante.....	6
1.4. PROPIEDADES TECNOLÓGICAS.....	7
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	9
2.1. OBJETIVOS.....	9
2.2. PLAN DE TRABAJO.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
3.1. EQUIPOS.....	10
3.2. MATERIA PRIMA.....	10
3.3. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL.....	11
3.3.1. Determinación de proteínas.....	11
3.3.2. Determinación de lípidos.....	12
3.3.3. Determinación de cenizas.....	12
3.3.4. Determinación de fibra dietética total.....	13
3.3.5. Determinación del contenido en aminoácidos totales.....	14
3.3.6. Determinación del contenido en Na, K, Ca y Mg.....	16
3.3.7. Determinación del anión cloruro.....	17
3.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.....	17
3.4.1. Preparación del extracto.....	17
3.4.1.1. Extracción con etanol.....	17
3.4.1.2. Extracción con mezclas de agua:metanol y agua:acetona.....	17
3.4.2. Determinación de compuestos fenólicos totales.....	18
3.4.3. Determinación de la capacidad antioxidante.....	19

3.4.3.1. Método del FRAP.....	19
3.4.3.2. Método del ABTS.....	19
3.5. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	19
3.5.1. Capacidad de retención de aceite.....	20
3.5.2. Capacidad de retención de agua.....	20
3.5.3. Capacidad de hinchamiento.....	20
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL.....	21
4.1.1. Contenido en proteínas, grasa y cenizas.....	21
4.1.2. Contenido en fibra dietética total.....	22
4.1.3. Contenido en aminoácidos.....	23
4.1.4. Contenido en Na, K, Ca y Mg, y en cloruros.....	26
4.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.....	28
4.2.1. Compuestos fenólicos totales (CFT).....	28
4.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante.....	30
4.2.2.1. Método del FRAP.....	30
4.2.2.2. Método del ABTS.....	31
4.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	32
4.3.1. Capacidad de retención de aceite.....	32
4.3.2. Capacidad de retención de agua.....	33
4.3.3. Capacidad de hinchamiento.....	33
5. CONCLUSIONES.....	35
6. BIBLIOGRAFÍA.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Etapa de destilación del análisis de proteínas.

Figura 3.2. Etapa de filtración de las muestras en el equipo Fibertec para el análisis de fibra.

Figura 3.3. Etapa de extracción de las muestras mediante la utilización de etanol como disolvente.

Figura 4.1. Contenido en proteínas, grasa y cenizas de las algas en polvo, expresado en g/100 g (peso seco). (Valor medio y desviación estándar (barras de error), n=3).

Figura 4.2. Contenido en aminoácidos totales, expresado en **(a)** mg aminoácido/g muestra (peso seco) **(b)** mg aminoácido/g proteína. (Valor medio y desviación estándar (barras de error), n=3). (Nombre completo de las abreviaturas en tabla 4.2).

Figura 4.3. Cromatograma de una muestra de algas (kombu) obtenido en el análisis de cationes.

Figura 4.4. Contenido en Na, K, Ca y Mg, expresado en g/100 g (peso seco). (Valor medio y desviación estándar (barras de error), n=3).

Figura 4.5. Contenido en compuestos fenólicos totales, expresado en mg de ácido gálico (GAE)/ g (peso seco). (Valor medio y desviación estándar (barras de error), n=3).

Figura 4.6. Capacidad antioxidante obtenida por el método FRAP **(a)** medida a tiempo 0 y **(b)** medida a tiempo 30 min, expresada en μmol de trolox/g (peso seco). (Valor medio y desviación estándar (barras de error), n=3).

Figura 4.7. Capacidad de retención de aceite (OHC – oil holding capacity) expresada en g aceite retenidos/g alga (peso seco), capacidad de retención de agua (WHC – water holding capacity) expresada en g agua retenidos/g alga (peso seco) y capacidad de hinchamiento (SC – swelling capacity) expresada en mL/g alga (peso seco). (Valor medio y desviación estándar (barras de error), n=3).

Figura 4.8. Algas hidratadas durante 18 h para la determinación de la capacidad de hinchamiento.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Programa de elución en gradiente.

Tabla 4.1. Contenido en fibra dietética total de las algas en polvo, expresado en g/100 g (peso seco). (Valor medio \pm desviación estándar, n=3).

Tabla 4.2. Aminoácidos identificados en las algas, junto con su abreviatura y tiempo de retención (t_R).

Tabla 4.3. Contenido en cloruros de las algas en polvo, expresado en g/100 g alga (peso seco) (valor medio \pm desviación estándar, n=3), y en g/100 g cenizas.

Tabla 4.4. Capacidad antioxidante obtenida por el método ABTS a los 10 min, expresada en μmol de trolox/g (peso seco). (Valor medio \pm desviación estándar, n=3).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LAS ALGAS

Las algas han formado parte de la cultura oriental desde la antigüedad, situándose en las regiones de Japón, China y Corea. En dichos países han sido utilizadas como parte de la dieta en sus preparaciones culinarias, pero se han extendido a lo largo de la historia hacia otras regiones, siendo conocidas ya en todo el mundo gracias a sus características y propiedades.

La introducción de la algas en Europa se está dando a gran escala en la industria alimentaria, biomédica y cosmética, para la elaboración de agentes gelificantes, espesantes y estabilizantes, así como en el ámbito culinario como ingrediente en la elaboración de platos y productos alimentarios a base de algas. Generalmente en España, para esta última finalidad, su uso es reducido, aunque poco a poco se va incrementando y podemos encontrar en el mercado una amplia gama de productos que contienen algas (Gómez-Ordóñez, 2013).

En la actualidad, son miles las especies de algas conocidas y distribuidas a lo largo de todo el planeta, ofreciendo un gran número de usos y aplicaciones. Además, las algas pueden clasificarse según sean verdes (*Chlorophyceae*), pardas (*Phaeophyceae*) o rojas (*Rhodophyceae*), aportando así una serie de propiedades características. Destinadas al consumo humano, existen alrededor de 200 especies de algas y se estima una producción anual de 90.000 toneladas en peso seco. De entre todas, las más consumidas y conocidas son nori (*Porphyra*), kombu (*Laminaria*), wakame (*Undaria*) y recientemente, espagueti de mar (*Himanthalia*). Las algas rojas y pardas son un alimento fundamental en la dieta tradicional japonesa, como se ha comentado ya. Según la región de cultivo hay preferencias por un tipo de alga u otro.

La producción total de algas marinas en el año 2005 fue de hasta 16 millones de toneladas, destacando la especie wakame como la más consumida, ya que es especialmente apreciada en Corea, donde su producción llegó a alcanzar las 33.000 toneladas en peso seco, situándose por encima del resto de especies consumidas. Las especies de *Laminaria* fueron pioneras en cuanto a cultivo y producción (FAO, 2007; FAO, 2010). Se estima que poco a poco van introduciéndose más especies autóctonas en el mercado, tanto para usos tecnológicos como para usos culinarios, ya que su potencial no es sólo alimenticio, sino también medicinal y cosmético, como se ha dicho anteriormente. Es interesante ver la presencia de algas en productos de uso cotidiano como pasta dentífrica, alimentos para animales y comidas para bebés, entre otros. Generalmente, en el mercado encontramos algas en forma deshidratada, aunque en algunos casos se comercializan como frescas. También es frecuente encontrarlas en polvo o en conserva, y sobre todo combinadas con otros ingredientes o alimentos (pasta con algas, té con algas, patés de algas, brioche con algas, cerveza con algas, etc.).

Las algas contienen una serie de compuestos bioactivos con un alto potencial beneficioso para nuestra salud, lo que indica el interés de introducirlas en una gran variedad de productos alimentarios como ingrediente funcional. La incorporación de algas en otros productos es mejorar o incrementar el valor nutricional del producto, ya que son ricas en vitaminas, minerales, fibra dietética, compuestos antioxidantes, etc. Tecnológicamente, los componentes de las algas pueden contribuir a una mejora de las propiedades físico-químicas de los

alimentos formulados a base de éstas. Por ejemplo, la fibra se utiliza como agente texturizante. Por otra parte, las algas también han sido estudiadas por su potencial efecto antimicrobiano (Barrow y Shahidi, 2008; Cox et al., 2010; Rupérez et al., 2002; Taskin et al., 2007).

1.2. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LAS ALGAS

Las algas marinas contienen un alto nivel de humedad, pudiendo alcanzar hasta el 94% del peso total en algunas especies (Holdt y Kraan, 2011). Se caracterizan por contener cantidades importantes de proteínas y aminoácidos, minerales, fibra y compuestos fenólicos responsables de la capacidad antioxidante. El contenido en grasa de las algas, por el contrario, es muy bajo (generalmente inferior al 1%). Una de las características nutricionales más relevante es su bajo aporte calórico, a pesar de presentar un importante contenido en polisacáridos. Esto se debe a que la mayoría de estos polisacáridos no pueden ser digeridos por el sistema digestivo humano, ya que forman parte de la fibra dietética.

Se ha comprobado que la composición química de las algas está directamente condicionada por la especie, la situación geográfica, las condiciones ambientales y especialmente la estación del año. Por ejemplo, las mayores concentraciones de proteínas se han observado en invierno y en primavera, mientras que las mínimas concentraciones se han obtenido en verano y otoño (Gómez-Ordóñez et al., 2010). En cuanto a la influencia de la especie, los polisacáridos mayoritarios varían según se trate de algas verdes, pardas o rojas. En algas pardas predominan los alginatos, fucanos y laminaranos. Las algas rojas contienen de forma mayoritaria galactanos sulfatados como es el agar y los carragenanos (Holdt y Kraan, 2011).

Debido a su composición nutricional, las algas se consideran uno de los alimentos más ricos y saludables nutricionalmente hablando.

1.2.1. Fibra alimentaria

A lo largo de los años se han atribuido bastantes efectos beneficiosos al consumo de fibra en la dieta humana. El consumo de alimentos que contienen fibra está directamente relacionado con una disminución de los desórdenes y enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon y diabetes. Se ha visto que posee actividad prebiótica, que reduce la absorción de colesterol y grasa en el intestino, evita el estreñimiento, la diverticulosis, etc.

De forma natural, en nuestra dieta incorporamos fibra al ingerir de forma cruda o procesada cereales, vegetales, legumbres y frutas. Hay que tener en cuenta que se deben satisfacer las necesidades diarias recomendadas de fibra para evitar desórdenes fisiológicos en nuestro organismo.

La fibra dietética se puede definir como una mezcla heterogénea de componentes que incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias asociadas, procedentes de las plantas que no son digeridos (degradados) por los enzimas presentes en el aparato digestivo, con completa o

parcial fermentación en el intestino grueso. La heterogeneidad en la composición que presenta la fibra dietética es la principal razón de la gran variedad de efectos fisiológicos que se producen en el organismo.

La fibra dietética está compuesta por fibra soluble e insoluble. La fracción insoluble se encarga de disminuir el tiempo de tránsito intestinal, aumentar la masa fecal y reducir el nivel de estreñimiento. Es decir, tiene un efecto laxante y regulador. Esto es debido a la no fermentación o fermentación escasa de la fibra insoluble en el intestino. La fracción soluble sufre un largo proceso de fermentación en el intestino grueso lo que conlleva a una reducción del colesterol y disminuye la absorción de glucosa en sangre (Jiménez-Escrig y Sánchez-Muniz, 2000).

Generalmente, el contenido en fibra dietética presente en las algas se encuentra en un rango comprendido entre el 33 y el 62% del peso seco, valores muy altos, siendo mayores que el de algunas frutas y hortalizas. Las algas pardas contienen los mayores valores de fibra dietética total (*Undaria* 58%) e insoluble (*Fucus* 40%) por delante de las algas verdes y rojas. Por otra parte, las algas con mayor contenido en fibra soluble son las rojas (*Chondrus* y *Porphyra* 15-22%, respectivamente).

El aporte de fibra que representa el consumo de algas ayudaría a satisfacer las necesidades de fibra establecidas (25-35 g/día) (FAO, 2015).

1.2.2. Proteínas

Las algas contienen niveles altos de proteínas en general. Como se ha comentado anteriormente, la fracción proteica que podemos encontrar en las algas marinas varía significativamente a lo largo del año y también con la especie. Generalmente, son las algas rojas y verdes las que presentan un mayor contenido en proteínas desde un 10 hasta un 47% (peso seco), destacando el alga nori por su alto porcentaje de proteínas, pudiendo ser comparada con el contenido proteico de la soja. Por el contrario, las algas pardas contienen niveles más bajos, que van desde un 3 hasta un 15% (peso seco), exceptuando la especie wakame que puede contener hasta un 24% (Fleurence, 1999).

Generalmente, las algas rojas debido a su alto nivel de proteínas, así como también a su composición en aminoácidos son consideradas como fuente de proteínas en los alimentos elaborados a partir de ellas. El uso de las algas como fuente proteica se está expandiendo de tal forma que se está empezando a utilizar como alimento para los peces criados mediante las técnicas de acuicultura. Otro de los usos más novedosos se ha destinado el ámbito deportivo basado en la incorporación de las algas en la dieta con la finalidad de conseguir mayor masa muscular (Fleurence, 1999).

Aminoácidos

Los aminoácidos son compuestos necesarios para llevar a cabo procesos metabólicos de nuestro organismo. Se encuentran formando parte de las proteínas y algunos de ellos, se

denominan esenciales porque no pueden ser sintetizados por el propio organismo y deben ser suministrados diariamente a través de la dieta.

En el caso de las algas, muchas de las proteínas presentes en ellas contienen niveles de aminoácidos esenciales cercanos a los niveles recomendados por la FAO. Las algas pardas contienen niveles de aminoácidos esenciales entre el 22 y el 44% del total. Las algas verdes entre el 26 y el 32% y por último, las algas rojas entre un 14 y un 19% (Fleurence, 1999). Son tales los niveles de estos aminoácidos que se llegan a comparar con las cantidades presentes en alimentos como el tomate o la patata (Coulier et al., 2011; Morris et al., 2007; Oruña-Concha et al., 2007) y en menor cantidad en comparación con algunas especies de setas (Beluhan y Ramogajec, 2011). De entre todos ellos, las algas también presentan cantidades importantes de ciertos aminoácidos esenciales como se ha comentado. En las algas verdes, se encuentran como aminoácidos esenciales principales la valina, leucina y lisina, encontrándose también histidina en concentraciones comparables a los niveles presentes en huevo y legumbres, siendo muy importante en la alimentación de niños. Por otra parte, las algas rojas contienen como aminoácidos esenciales la leucina, valina y metionina en cantidades comparables con los niveles que presenta la albúmina del huevo. Además, otros aminoácidos como isoleucina y treonina figuran en las algas en cantidades similares a las que contienen la familia de las leguminosas (Fleurence, 1999). Dentro de los tipos de aminoácidos que existen, se han encontrado una serie de estudios en los que el ácido aspártico y el ácido glutámico constituyen el mayor porcentaje de aminoácidos presente en las algas con un valor del 26% (Peinado et al. 2014).

Estos datos dan idea de la importancia que tiene la fracción proteica de las algas, por ser alto el contenido proteico y las proteínas de alto valor biológico.

1.2.3. Grasas

A pesar de que las algas contienen valores mínimos o muy bajos en lípidos, presentan una composición en ácidos grasos de alta calidad. La composición en ácidos grasos de las algas está ampliamente influenciada por la situación geográfica y el ambiente que les rodea en su hábitat, así como por distintos factores genéticos que determinan una cierta variabilidad de estos compuestos dentro de cada especie. Generalmente, las algas rojas presentan menor cantidad de estos compuestos en comparación con las algas pardas, e incluso dentro de cada especie de algas pardas hay diferencias significativas en cuanto al porcentaje de ácidos grasos que contiene cada una de ellas (Peinado et al. 2014).

Dentro del grupo de ácidos grasos saturados, las algas son más ricas en ácido palmítico, margárico (ácido heptadecanoico) y esteárico. En cuanto al grupo de los monoinsaturados, destaca el ácido oleico que difiere mucho en cuanto a su cantidad, en un rango entre 21,9 y 41,45% en algunas especies de algas pardas. El interés de la fracción lipídica de las algas, se debe fundamentalmente a su contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Algunos de los PUFA están presentes en mayores cantidades que en vegetales terrestres (Sánchez-Machado et al., 2004). Dentro de este grupo destacan el ácido linoleico y el α -linolénico. Estos PUFA pueden contribuir a disminuir los niveles de colesterol en sangre, fortalecen las

membranas celulares, reparan células y tejidos dañados y actúan frente a células cancerígenas. También es de destacar su poder antiviral, antimutagénico y cardio-protector (Syad et al., 2013).

1.2.4. Cenizas

Como es sabido, el contenido total de cenizas presente en las algas da idea de la proporción de minerales presentes en las mismas. El contenido de minerales en las algas adquiere valores significativamente altos, entre un 8 y 40% expresado en peso seco. Las algas son uno de los alimentos más completos en cuanto a tipo de minerales se refiere, si se comparan con plantas terrestres y con productos de origen animal, colocándose éstas por delante (Rupérez, 2002). Las variaciones en cuanto a los porcentajes de minerales se debe a la especie de alga, a la situación geográfica, a la estación del año y a factores ambientales. En el caso de las algas pardas como *Fucus*, *Laminaria* y *Undaria* corresponden al grupo con los porcentajes de minerales más altos. Las algas rojas presentan menores cantidades, aunque tampoco son despreciables. Finalmente, las algas verdes son las que menor cantidad de minerales presentan, pero aun así están catalogadas con un índice significativo de material mineral. Estos datos llevan a considerar a las algas como ingredientes funcionales en la formulación de productos para la alimentación humana, teniendo en cuenta las necesidades diarias de macrominerales y de minerales a nivel traza necesarios para un correcto funcionamiento del organismo (Rupérez, 2002).

En la composición mineral que presentan las algas destaca el Na, K, Ca y Mg como macroelementos esenciales y dentro de los elementos traza el P, Fe, Zn, Mn, Cu. En cuanto a la composición en aniones, cabe destacar el ión sulfato y el ión cloruro (Gómez-Ordóñez et al., 2010).

1.3. COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS ALGAS

1.3.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se encuentran, generalmente, en las plantas y vegetales. Dentro de este gran grupo se encuentran los ácidos fenólicos, los polifenoles y los flavonoides (Echevarría et al., 2009). Se trata de una serie de compuestos de gran interés debido a que poseen capacidad antioxidante, lo que implica un efecto beneficioso para nuestro organismo y también es interesante desde el punto de vista tecnológico, ya que actúan como antioxidantes naturales. En este sentido, numerosos estudios dedicados a conocer el potencial que presentan las algas de cara a nuestra dieta, han relacionado algunos de los compuestos fenólicos con la capacidad de prevenir problemas cardiovasculares, cáncer, artritis y desórdenes inmunológicos, al actuar protegiendo los tejidos frente a la oxidación (Wang et al., 2009).

Comparando entre las grandes especies de algas, las verdes y las rojas son las que contienen menor concentración de compuestos fenólicos. Por el contrario, las algas pardas contienen mayor cantidad, como es el caso de las especies *Fucus* y *Ascophyllum* (Holdt y Kraan, 2011). Los principales compuestos fenólicos determinados en distintos estudios de algas han sido el ácido gálico, el ácido protocatecuico y el ácido gentísico. De hecho, en algunas especies de algas rojas y pardas únicamente se encuentran estos tipos de ácidos fenólicos. En algunas especies de algas pardas se han encontrado también otros ácidos como el clorogénico, vanílico y cafeico, entre otros (Chandini et al., 2008; Farvin y Jacobsen, 2013). Otros tipos de compuestos fenólicos encontrados en algas verdes, rojas y pardas, han sido las catequinas, flavonoles y flavonoles glicósidos (Santoso et al., 2002; Yoshie-Stark et al., 2003).

En cuanto a las diferencias entre los porcentajes de compuestos fenólicos presentes en las algas, cabe destacar la influencia de la especie, de la estación del año y de factores ambientales como la luz, la salinidad y los nutrientes (Farvin y Jacobsen, 2013).

1.3.2. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante presente en los alimentos de origen vegetal se debe a la acción sinérgica de una amplia variedad de antioxidantes, entre otros, las vitaminas C y E, y los polifenoles. Esta propiedad se considera como la actividad biológica responsable del efecto preventivo en ciertas enfermedades de tipo cardiaco e inmunológico, de ahí el motivo del creciente interés en el desarrollo de técnicas para determinar el potencial antioxidante que presentan los alimentos (Pérez-Jiménez et al., 2008).

Los principales antioxidantes en las algas son los compuestos fenólicos. Seguidamente, nos encontramos las vitaminas y los carotenoides, los cuales se encuentran también en cantidades significativas (Pérez-Jiménez et al., 2008). Cabe destacar la actividad antioxidante de los florotaninos, compuestos de naturaleza polifenólica que se encuentran exclusivamente en las algas pardas.

La capacidad antioxidante se ve afectada por la especie de alga y principalmente por las condiciones de procesamiento que puedan sufrir hasta su consumo. Además, la determinación de la capacidad antioxidante se ve altamente afectada por el método de análisis, tanto por la etapa de preparación de las muestras y extracción de los antioxidantes, como por el fundamento de la técnica. Por ello, se suele utilizar más de un método a la hora de evaluar la capacidad antioxidante de un alimento o de un compuesto (Frankel y Meyer, 2000).

En comparación con las plantas terrestres, a lo largo de los últimos años se ha incrementado el interés por estudiar la capacidad antioxidante que presentan las algas y en los que se ha demostrado su fuerte potencial como fuente natural de antioxidantes. Chew et al. (2008) comparó la capacidad antioxidante de tres tipos de algas, una parda (*Padina antillarum*), una verde (*Caulerpa racemosa*) y una roja (*Kappaphycus alvarezzi*), concluyendo que las algas pardas contienen una mayor capacidad antioxidante en comparación con las algas verdes y rojas. Esto se justifica por la presencia de catequina, epigallocatequina, florocatequina y fucoxantinas. Resultados similares fueron dados por O'Sullivan et al. (2011).

Teniendo en cuenta que la oxidación lipídica es uno de los procesos de deterioro más importantes en alimentos, es necesario el uso de antioxidantes en muchos productos. Tradicionalmente se han utilizado antioxidantes sintéticos como el butil-hidroxitolueno (BHT) o el butil-hidroxianisol (BHA). Sin embargo, el uso de este tipo de compuestos se ha venido restringiendo debido a problemas de toxicidad. Además hay una tendencia en el consumo hacia productos naturales sin aditivos. En este sentido, el empleo de algas como antioxidantes naturales es muy interesante.

1.4. PROPIEDADES TECNOLÓGICAS

Las propiedades físico-químicas de las algas, tales como las propiedades de hidratación, vienen determinadas por la cantidad de fibra presente en ellas y por el tipo de fibra (soluble o insoluble). Las propiedades de hidratación se pueden determinar midiendo la capacidad de retención de agua (WHC) y la capacidad de hinchamiento (SC). La capacidad de retención de agua se define como la cantidad de agua retenida por cada gramo de muestra, teniendo en cuenta una serie de parámetros como la temperatura, el tiempo y la velocidad de centrifugación. La capacidad de hinchamiento se calcula a partir del aumento de volumen por cada gramo de muestra que experimenta ésta al hidratarse bajo unas condiciones de tiempo y temperatura determinadas. Conjuntamente con estos dos parámetros, se suele medir la capacidad de retención de aceite (OHC).

La capacidad que tiene la fibra dietética para retener el agua depende en gran medida de la procedencia de la fibra. De hecho, la fibra dietética presente en las algas tiene mayor afinidad por el agua y por el aceite que otras fibras, como en el caso de los cereales, siendo ésta mucho menor. Destacar que las propiedades de hidratación se ven incrementadas por un aumento de la temperatura, ya que de esta forma se lleva a cabo un aumento de la solubilidad, favoreciendo la hidratación de la fibra (Elleuch et al., 2011; Fleury y Lahaye, 1991).

Los valores de estos parámetros se pueden ver ligeramente modificados en función de la especie de alga. Estas propiedades hacen que su incorporación en alimentos sea interesante porque pueden aportar una mayor capacidad de retención de agua y una mejora en las propiedades de unión de la grasa. Jugando con la variabilidad de productos y de los tipos de algas se pueden potenciar unas características u otras. Por ejemplo, en productos emulsionados a partir de derivados cárnicos como las salchichas Frankfurt se consiguió una mejora en la textura y estabilidad de la emulsión (Kim et al., 2010; López-López et al., 2009). En el caso de la pasta también se vio mejorada la dureza tras el proceso de cocción por la adición de algas (Chang y Wu, 2008).

Por todo lo expuesto anteriormente, el empleo de algas en el desarrollo de nuevos productos es muy interesante, ya que se trata de un ingrediente natural funcional que podría aportar nutrientes esenciales y además, algunas de ellas, presentan ciertas características que permitirían sustituir a algunos aditivos en los productos desarrollados. Esto iría en línea con las demandas de los consumidores actuales, que están interesados en alimentos con alto valor

nutritivo, que sean saludables, con propiedades funcionales y sin aditivos químicos. Cabe destacar que entre las 10 tendencias en el consumo de alimentos para 2015, la primera de ellas es el consumo de alimentos naturales funcionales (FOODStuff, 2015).

Dado el origen marino de las algas es muy interesante su adición a productos derivados de la pesca.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar las algas nori, kombu, wakame y espagueti de mar, con el fin de evaluar si su empleo como ingrediente en distintos productos alimenticios, aportaría una mejora en la calidad nutricional y en las propiedades físico-químicas de los mismos.

Para alcanzar este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización de la composición nutricional
- Estudio de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos
- Estudio de distintas propiedades físico-químicas.

2.2. PLAN DE TRABAJO

Para la consecución de los objetivos propuestos se planteó el siguiente plan de trabajo:

- 1.- Revisión bibliográfica de metodologías analíticas y parámetros de interés
- 2.- Puesta a punto de los métodos de análisis
- 3.- Determinación de la composición nutricional
- 4.- Determinación de la capacidad antioxidante y de compuestos fenólicos
- 5.- Determinación de parámetros físico-químicos relacionados con las propiedades tecnológicas de las algas.
- 6.- Tratamiento estadístico de los datos e interpretación de resultados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. EQUIPOS

Los equipos utilizados en este trabajo fueron:

- Agitador magnético con calefacción Stirrer, modelo FB1 5001 (J.P. Selecta S.A., Barcelona, España).
- Analizador automático de cloruros Sherwood (modelo 926) (Sherwood Scientific Ltd., Cambridge, UK).
- Analizador de fibra Fibertec 1023 E (Foss System, Hilleroed, Denmark).
- Balanza Exacta modelo PD22 (Alessandrini, Italia).
- Balanza Kern modelo EG 220-3NM (Kern & Sohn, Balingen, Alemania).
- Baño de ultrasonidos con temporizador, frecuencia 45 KHz VWR (modelo USC100T) (VWR International Eurolab, S.L., Llinars del Vallés, Barcelona).
- Baño termostático POLY SCIENCE con temperatura máxima de 200° C (USA).
- Centrífuga refrigerada. Medifriger BL (JP Selecta, S.A., Barcelona, España).
- Congelador Liebherr modelo GNP (Liebherr-Internacional, Deutschland GmbH, Biberach an der Riss, Alemania).
- Cromatógrafo líquido Hitachi LaChrom Elite (Hitachi Ltd., Tokio, Japón) con bomba (modelo L-2130), automuestreador (modelo L-2200) y detector UV (modelo L-2400).
- Cromatógrafo de intercambio iónico con detector de conductividad de Metrohm.
- Espectrofotómetro de UV-Visible Thermo Scientific (modelo Helios Alfa) (Thermo Fisher Scientific Inc., EE UU).
- Estufa Binder GMBH, modelo FD 115 (Tuttlingen, Alemania), temperatura máxima 300° C.
- Frigorífico Liebherr modelo Profiline (Liebherr-Internacional, Deutschland GmbH, Biberach an der Riss, Alemania).
- Mufla JP-Selecta modelo 367 PE (J.P. Selecta S.A., Barcelona, España).
- pH-metro Crisol Basic 20+, con electrodos de punción para productos sólidos (Crison Instruments S.A., Barcelona, España).
- Unidad de destilación JP-Selecta Pro-Nitro (JP. Selecta S.A., Barcelona, España).
- Unidad de digestión JP-Selecta Bloc Digest 6 (JP. Selecta S.A., Barcelona, España).
- Sistema de extracción Soxtec Avanti 2055 (Foss Analytical A.B., Höganäs, Suecia).

3.2. MATERIA PRIMA

Para este estudio se emplearon las siguientes algas en polvo: nori (*Porphyra* spp.) que es un alga roja, wakame (*Undaria pinnatifida*), kombu (*Laminaria ochroleuca*) y espagueti de mar (*Himanthalia elongata*) que son algas pardas. Estas algas fueron suministradas por la empresa gallega Porto Muiños (Cerceda, A Coruña, España). La empresa es la que lleva a cabo el cultivo de las algas en las costas atlánticas del noroeste de la Península Ibérica, su recolección y procesado. Se seleccionaron estas algas porque habían sido empleadas en el desarrollo de alimentos saludables a base de pescado (hamburguesas, patés y salchichas), en estudios previos del grupo de investigación (Albalat, 2015; Penalba et al., 2014; Sirvent, 2015).

3.3. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

Para evaluar la composición nutricional de las algas, se determinó su contenido en proteínas, lípidos, cenizas, fibra, aminoácidos, cationes (sodio, potasio, calcio y magnesio) y el anión cloruro. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado (n=3) excepto la de fibra y aminoácidos que se hizo por duplicado (n=2).

3.3.1. Determinación de proteínas

El análisis del contenido en proteínas se llevó a cabo siguiendo el método Kjeldahl descrito en el método 928.08 de la AOAC (1997). El análisis consta de tres etapas: digestión, destilación y valoración.

En la etapa de digestión se introdujeron en un tubo Kjeldahl 1,5 g de muestra exactamente pesada y 3 g de catalizador (K_2SO_4 , $CuSO_4$ y Se (10:1:0,1)). A continuación, se adicionaron 10 mL de H_2SO_4 (98% v/v) y 5 mL de H_2O_2 (30% v/v). Los tubos se introdujeron en la unidad de digestión, donde se calentaron a 450 °C hasta digestión completa. Se consideró la digestión finalizada cuando la disolución contenida en el tubo adquirió una coloración verde esmeralda. En la siguiente etapa de destilación, la disolución obtenida tras la digestión se dejó enfriar, se diluyó con 50 mL de agua destilada y se llevó a la unidad de destilación, donde se añadió un exceso de hidróxido sódico 10 N y se destiló durante 4 min (figura 3.1). El amoníaco liberado durante la destilación se recogió sobre 15 mL de una disolución de ácido bórico (4% p/v).



Figura 3.1. Etapa de destilación del análisis de proteínas.

En la etapa de valoración el amoníaco recogido sobre el ácido bórico se valoró con H_2SO_4 0,3 N en presencia del indicador Shiro T-Shiro (disolución de rojo de metilo al 0,2 % y azul de metileno al 0,1 % en alcohol etílico), hasta el viraje de la disolución desde verde (medio básico) a violeta (medio ácido).

Paralelamente se realizó un ensayo en blanco.

El % de proteína expresado en g de proteína por 100 g de muestra se calculó mediante la ecuación 1:

$$\% \text{ proteína} = \frac{(V_m - V_b) \cdot N_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot f \cdot \text{Peq}_{\text{N}_2} \cdot 6,25 \cdot 100}{m} \quad (\text{ec. 1})$$

Donde:

V_m = volumen de ácido empleado en la valoración (L).

V_b = volumen de ácido empleado en el ensayo en banco (L).

$N_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = normalidad del ácido sulfúrico.

f = factor de la normalidad del ácido sulfúrico.

$\text{Peq}_{\text{N}_2} = 14$.

m = masa de la muestra (g).

3.3.2. Determinación de lípidos

La determinación de grasa se basó en el método 991.36 de la AOAC (1997), realizándose una extracción con éter de petróleo.

Al tratarse de una muestra deshidratada, se pesaron aproximadamente 10 g de muestra (m_0) en un sobre de papel de filtro. A continuación, se introdujo en un cartucho de extracción de celulosa Albet® 900 (Filalbet, Barcelona, España) de dimensiones 22 x 80mm. Este cartucho se colocó en el equipo automático de extracción Soxtec™. La materia grasa se recogió en unas cubetas de extracción de metal, previamente desecadas, atemperadas y pesadas. El cálculo del porcentaje de grasa expresado en g de proteínas por 100g de muestra se realizó mediante la siguiente ecuación 2:

$$\% \text{ grasa} = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100 \quad (\text{ec. 2})$$

Donde:

m_0 = masa de la muestra (g)

m_1 = masa de la cubeta vacía (g)

m_2 = masa de la cubeta con la grasa extraída (g)

3.3.3. Determinación de cenizas

La determinación de cenizas se realizó según el método 920.153 de la AOAC (1997).

Se metían los crisoles con sus tapas durante 2 h en la mufla a 550°C. Se enfriaban posteriormente en el desecador hasta temperatura ambiente. Se pesaba el crisol y la tapa con precisión de $\pm 0,0001$ g (m_1), y se introducían aproximadamente 1,5 g de muestra exactamente pesados (m_2). Posteriormente se ponía el crisol con la muestra en una placa calefactora y una vez carbonizada, se ponía en la mufla a 550°C durante 5 h hasta obtener cenizas blancas. Los crisoles con las tapas y las cenizas eran enfriados hasta temperatura ambiente en un desecador y posteriormente pesados (m_3).

El contenido en cenizas (g cenizas/100 g muestra) se calculaba aplicando la ecuación 3:

$$\text{g cenizas/100 g muestra} = \frac{m_3 - m_1}{m_2} \times 100 \quad (\text{ec. 3})$$

Donde:

m_1 = masa en g del crisol con la tapa.

m_2 = masa en g de la muestra antes de meterla en la mufla.

m_3 = masa en g del crisol con la tapa y las cenizas.

3.3.4. Determinación de fibra dietética total

La determinación de la fibra dietética total se llevó a cabo según el método de la AOAC 991.43 (1997), empleando el equipo de fibra Fibertec 1023 E.

Las algas marinas eran deshidratadas por lo que algunos de los pasos, como la preparación previa al análisis de la muestra, no hubo que realizarlos. El primer paso para el análisis fue pesar aproximadamente 1 g de muestra en un matraz de incubación, añadir 40 mL de tampón MES-TRIS previamente preparado y ajustar el pH a 8,2. Después se agitaron cada uno de los matraces suavemente durante unos segundos. Este método requiere la utilización de un kit enzimático (TDF-kit (Megazyme-Kit)) para llevar a cabo la reacción de separación de la fibra dietética presente en las algas. El kit enzimático contiene α -amilasa termoestable, proteasa y amiloglucosidasa. Tras haber realizado la agitación, se le añadió a cada muestra 50 μ L de α -amilasa y se agitó unos segundos para que reaccionase. Seguidamente se cubrían los matraces con papel de aluminio y se introducían en un baño previamente calentado a una temperatura de 95°C durante 15 min. Cada 3 min se agitaban manualmente los matraces. Una vez transcurridos los 15 min establecidos se dejaban reposar las muestras hasta llegar a una temperatura de 60°C para continuar con el procedimiento. Se lavaban las paredes del matraz con 10 mL de agua destilada para evitar que quedase parte de la muestra adherida a las paredes. Después de este paso se añadían 100 μ L de proteasa. La proteasa viene en forma sólida por lo que se preparaba previamente una disolución de 40 mg de proteasa con 800 μ L de tampón MES-TRIS. Para que reaccionase la proteasa se volvían a introducir los matraces tapados con papel de aluminio en el baño a 60°C durante 30 min en agitación constante. Transcurrido dicho tiempo se añadía a cada muestra 5 mL de HCl 0,561 N y se ajustaba el pH hasta 4-4.7 con NaOH 1 N. A continuación se introducían 300 μ L de amiloglucosidasa y se llevaban las muestras de nuevo al baño de 60°C en agitación durante otros 30 min. Al finalizar este tiempo se añadían a los matraces 225 mL de etanol del 96% que había sido previamente calentado a 60°C y se dejaba en reposo 1 h a temperatura ambiente para que precipitara también la fibra soluble. El siguiente paso era la filtración a vacío, que se llevaba a cabo en el equipo Fibertec 1023 E (figura 3.2), recogiendo el precipitado en los crisoles del equipo. Durante la filtración se realizaban una serie de lavados, 2 con 15 mL de etanol al 78% y 2 más con 15 mL de etanol al 96% para evitar que quedasen residuos sin filtrar adheridos a las paredes del recipiente.

En el precipitado recogido en los crisoles estaría la fibra junto con cenizas y proteínas. Para calcular la cantidad de fibra dietética total, se determinaba el contenido en cenizas y el

contenido en proteínas de ese precipitado, y por diferencia se obtenía el contenido en fibra. Por ello, de cada muestra, se hacían 2 preparaciones, obteniéndose 2 crisoles, uno de ellos se llevaba a calcinar a 550°C para obtener el contenido en cenizas y al segundo se le analizaba el contenido en proteínas por el método Kjeldhal.

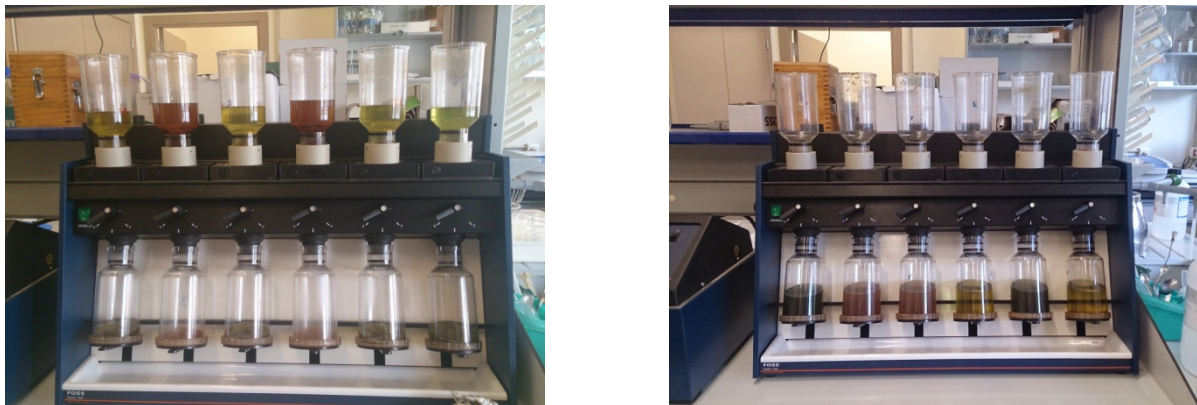


Figura 3.2. Etapa de filtración de las muestras en el equipo Fibertec para el análisis de fibra.

3.3.5. Determinación del contenido en aminoácidos totales

El análisis de aminoácidos se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución con detector de UV y derivatización pre-columna.

Preparación del extracto:

La preparación de la muestra consistió en la hidrólisis ácida de las proteínas para liberar los aminoácidos. Esta etapa se realizó siguiendo el método descrito en el Reglamento (CE) nº 152/2009 (Comisión Europea, 2009), con algunas modificaciones. En un tubo de vidrio de tapón de rosca, se pesaban aproximadamente 0,1 g de muestra (alga en polvo) con una precisión de $\pm 0,0001$ g. Se añadía 1 mL de HCl 6 N y se calentaba durante 1 h en baño de agua hirviendo. Durante este tiempo se colocaba el tapón de rosca sobre el tubo sin cerrar para permitir la salida de gases y evitar la explosión del tubo. A continuación se cerraba el tubo y se dejaba en estufa a 110 °C durante 23 h. Una vez finalizada la hidrólisis se abría cuidadosamente el tubo y se dejaba enfriar en baño de agua. A continuación se añadía 1 mL de una mezcla de HCl 0,1 N: etanol (1:1, v:v) y se filtraba. El extracto obtenido en el líquido filtrado se derivatizaba.

Derivatización de los aminoácidos:

El procedimiento de derivatización y de análisis empleado fue basado en el método descrito por Concha-Herrera et al. (2010). El reactivo derivatizante era una disolución que contenía $1,25 \times 10^{-2}$ M de orto-ftalaldehído (OPA) y $2,5 \times 10^{-2}$ M de N-acetilcisteína (NAC), tamponando con buffer borato a pH 9,5.

Se tomaban 100 μL del filtrado obtenido en la etapa anterior, se adicionaban 25 μL de NaOH 10 N para neutralizar el medio y seguidamente se añadía 1 mL del reactivo derivatizante (OPA-NAC). Se agitaba, se filtraba en filtro de Nylon de 13 mm x 0,45 μm y se recogía en un vial que era introducido en el inyector del cromatógrafo.

Análisis cromatográfico:

El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido con detector UV. Para la adquisición de datos se empleó el software EZChrom Elite software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

La separación se realizó en una columna de fase reversa Kromaphase C18, de 150 x 4,6 mm, con un diámetro interno de partícula de 5 μm (Scharlab, Barcelona, España). Se empleó una pre-columna con el mismo relleno para proteger a la columna de impurezas.

Las condiciones cromatográficas, seleccionadas en base a la bibliografía y a las pruebas realizadas en el laboratorio, fueron las siguientes:

- Volumen de inyección: 20 μL

- Fases móviles:

Fase móvil A: Disolución de ácido cítrico 5 mM en agua ajustando el pH a 6,5 con NaOH.

Fase móvil B: Acetonitrilo.

Las fases móviles fueron filtradas con filtro de 47 mm de membrana de nylon de 0,45 μm .

- Flujo de la fase móvil: 1 mL/min

- El programa de elución en gradiente se muestra en la tabla 3.1.

- Los cromatogramas se registraron a una longitud de onda de 335 nm.

Tabla 3.1. Programa de elución en gradiente.

Tiempo	Fase móvil A (%)	Fase móvil B(%)
0	95	5
30	70	30
35	50	50
37	95	5
45	95	5

A: Disolución de ácido cítrico 5 mM pH=6,5

B: Acetonitrilo

Identificación y cuantificación:

Para la identificación de los picos correspondientes a los analitos analizados en la muestra, se inyectaron en el equipo HPLC por separado, disoluciones patrón de 15 aminoácidos: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), alanina (Ala), asparagina (Asn), arginina (Arg), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), serina (Ser), tirosina (Tyr), treonina (Thr) y valina (Val). Los patrones se prepararon en HCl 0,1 N:etanol (1:1, v:v). La derivatización de los patrones se llevó a cabo del mismo modo que la de la muestra. La identificación se llevó a cabo comparando los tiempos de retención de estos patrones con los correspondientes picos obtenidos en los cromatogramas de las muestras y se confirmó con la técnica de adición de patrón (Johnson y Stevenson, 1978).

La cuantificación se hizo por el método del patrón externo. Se preparaban disoluciones de cada patrón a diferentes concentraciones, se inyectaban en el cromatógrafo y de los cromatogramas registrados, se obtenían las áreas correspondientes a cada analito para cada concentración. A continuación se construían las rectas de calibrado para cada uno de los patrones, representando el área del pico frente a la concentración de patrón. De los cromatogramas de las muestras, se obtenían las áreas para cada compuesto y haciendo uso de las ecuaciones de las rectas de calibrado, se calculaba la concentración de analito en el extracto de la muestra.

3.3.6. Determinación del contenido en Na, K, Ca y Mg

El análisis de cationes se llevó a cabo por cromatografía de intercambio iónico.

Preparación del extracto:

Para obtener el extracto de cada muestra se partió de las cenizas obtenidas tal y como se ha explicado en el apartado 3.3.3. Las cenizas de las muestras fueron disueltas en HNO₃ 2 mM, aforando a 10 mL. A continuación se hizo una dilución 1:100, se filtró y se inyectó en el cromatógrafo.

Análisis cromatográfico:

El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de intercambio iónico con detector de conductividad. La separación se realizó en una columna Metrosep C2, 250/4.0 y para la adquisición de datos se empleó el software IC Net 2.3 (Metrohm Ltd., Suiza).

Las condiciones cromatográficas, seleccionadas en base a las recomendaciones del fabricante de la columna, fueron las siguientes:

- Volumen de inyección: 10 µL
- Fase móvil: Disolución de ácido tartárico 4 mM y ácido dipicolínico 0,75 mM.
- Flujo de la fase móvil: 1 mL/min

Identificación y cuantificación:

La identificación y cuantificación de los analitos se llevó a cabo de la misma forma que se ha explicado en el apartado 3.3.5 para la determinación de aminoácidos.

3.3.7. Determinación del anión cloruro

Para la determinación del contenido en cloruros de las muestras de algas se pesaron aproximadamente 0,4 g de cada una de ellas por duplicado y se introdujeron en un matraz aforado enrasándolo hasta 50 mL con agua destilada. El siguiente paso fue introducir la solución en tubos de centrífuga y realizar el proceso de centrifugación a una velocidad de 4000rpm a temperatura ambiente (20°C) durante 10 minutos. Del sobrenadante se tomaron 2 mL y se aforó a 10 mL con agua destilada (dilución 1:5). De esta disolución se tomó una alícuota de 500 µL para llevar a cabo la valoración en el analizador automático de cloruros Sherwood mod 926 (Sherwood Scientific Ltd., Cambridge, UK).

El equipo proporciona un valor de la lectura en mg de ion cloruro/L. A partir de este valor se calculó la concentración de cloruros en las muestras mediante la ecuación 4:

$$\frac{g \text{ Cl}^-}{100g \text{ muestra}} = \frac{\text{Lectura} \cdot V \cdot f}{m \cdot 10} \quad (\text{ec. 4})$$

Donde:

Lectura = valor dado por el equipo (mg Cl⁻/L)

V = volumen de la disolución de alga (L)

m = masa de la muestra (g)

f = factor de la dilución de la muestra

3.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

3.4.1. Preparación del extracto

Teniendo en cuenta que la determinación de estos parámetros está altamente influenciada por los métodos y disolventes empleados en la extracción de los compuestos fenólicos y otros compuestos antioxidantes, en este trabajo se utilizaron dos métodos de extracción diferentes.

3.4.1.1. Extracción con etanol

El método de extracción seguido se basó en el descrito por Farvin y Jacobsen (2013). En un erlenmeyer se pesó aproximadamente 1 g de cada muestra de alga en polvo al que se le añadieron 10 mL de etanol. Se dejaron las muestras en agitación en un agitador magnético

durante 2 h (figura 3.3). Transcurrido este tiempo las muestras se introdujeron en tubos de centrífuga y se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente (20 °C) y finalmente fueron filtradas.

3.4.1.2. Extracción con mezclas de agua:metanol y agua:acetona

Se siguió el método descrito por Pérez-Jiménez et al. (2008). Se pesaron 0,5 g de cada muestra y se le añadieron 20 mL de una mezcla metanol agua (50:50, v/v) acidificada a pH 2 con HCl. Seguidamente, se dejaron las muestras en agitación durante 1 h en un agitador magnético. A continuación se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min y se filtró. Se recogió el sobrenadante y al precipitado se le añadieron 20 mL de acetona/agua (70:30, v/v), volviéndose a repetir los pasos de agitación, centrifugación y filtración. El segundo sobrenadante se mezcló con el primero y así se obtuvo el extracto de la muestra, al que se le llamó extracto metanólico.

3.4.2. Determinación de compuestos fenólicos totales

Se llevó a cabo en ambos extractos de la muestra (etanólico y metanólico), siguiendo el método descrito por Farvin y Jacobsen (2013). En un tubo de ensayo se pusieron 100 μ L de cada extracto, se adicionaron 750 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu en agua (1:10) y se dejaron reposar en oscuridad durante 5 min. Seguidamente, se adicionaron 750 μ L de NaHCO_3 (6%). A continuación, se volvieron a dejar las muestras en reposo a temperatura ambiente durante 90 min en oscuridad para evitar oxidaciones de los componentes y una buena reacción de los constituyentes. Finalmente, en el espectrofotómetro se realizó la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 725 nm. Se preparó una recta de calibrado con ácido gálico y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/g de alga. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

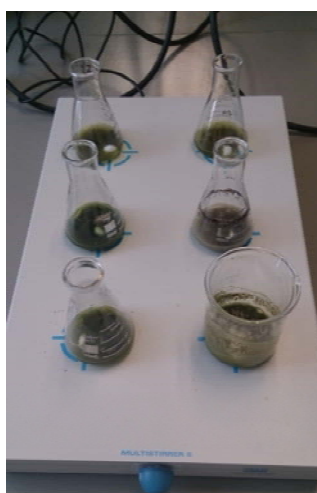


Figura 3.3. Etapa de extracción de las muestras mediante la utilización de etanol como disolvente.

3.4.3. Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de un alimento se debe a diferentes tipos de compuestos con mecanismos de acción muy variados y que además pueden interaccionar sinérgicamente. Por ello, es necesario emplear más de un método para determinar la capacidad antioxidante de los alimentos, como ya se ha comentado. Por ello, en este estudio se emplearon dos métodos: el método del FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) y el método del ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)). Las determinaciones en ambos métodos se llevaron a cabo por triplicado.

3.4.3.1. Método del FRAP

El método del FRAP utilizado para el análisis fue establecido y ajustado a las muestras de las algas según estudios de Pulido et al. (2000). El reactivo FRAP contiene una mezcla de TPTZ 10 mM en HCL 40 mM, FeCl₃ 20 mM y tampón acetato 0,3 M a pH 3,6. Este compuesto debe ser preparado diariamente para evitar la degradación de los componentes y también es imprescindible para un buen resultado mantenerlo a una temperatura de 37°C. Para realizar la determinación, se tomaron 50 µL del extracto de todas las muestras (etanólico o metanólico) y se introdujeron en un tubo de ensayo junto con 50 µL de tampón acetato y 900 µL de la disolución FRAP preparada. Las muestras se dejaron reposar durante 30 min y posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La lectura se tomó al inicio (tiempo 0) y transcurridos 30 min. Se preparó una recta de calibrado con trolox. El resultado se expresó como µmoles de trolox/g de alga.

3.4.3.2. Método del ABTS

El método del ABTS se realizó llevando a cabo un protocolo de decoloración basado en diferentes estudios (Re et al., 1999; Sánchez-Alonso et al., 2008). Se pesaron 66 mg del reactivo ABTS y se adicionó 10 mL de una disolución de persulfato potásico 2,45 mM. La mezcla se dejó reposar en oscuridad durante 14 h a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 658 nm y se diluyó con agua hasta conseguir un valor de absorbancia 0,70±0,02. A continuación se tomaron 40 µL del extracto metanólico de cada una de las muestras, se añadieron 1,5 mL de la disolución de ABTS ajustada y se midió la absorbancia durante 10 min a intervalos de 2 min. Este método no se aplicó al extracto etanólico, como más adelante se describe en el apartado de Resultados. . Se preparó una recta de calibrado con trolox. El resultado se expresó como µmoles de trolox/g de alga.

3.5. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Para la determinación de los parámetros físico-químicos de las algas se siguieron los métodos descritos por Gómez-Ordóñez et al. (2010). Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

3.5.1. Capacidad de retención de aceite

Se pesaron 500 mg de cada una de las algas en tubos de centrífuga. A continuación, se añadieron 30 mL de aceite de oliva y se realizó una suave agitación para conseguir una correcta micción de la muestra y el aceite. Posteriormente se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 h en oscuridad. Pasado este tiempo, se centrifugaron las muestras a 10000rpm durante 20 min a una temperatura de 20°C. Finalmente se pesó el precipitado y se calculó la capacidad de retención de aceite, expresándola como g de aceite retenido/g de alga.

3.5.2. Capacidad de retención de agua

Al igual que en el caso anterior, se pesaron 500 mg de cada una de las muestras de algas en tubos de centrífuga, a los que se añadieron 30 mL de agua destilada. Se agitó suavemente para una adecuada micción y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 h en oscuridad. A continuación se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 20 min a 20°C. Por último se pesó precipitado y se calculó la capacidad de retención de agua como g de agua retenida/g de alga.

3.5.3. Capacidad de hinchamiento

Se pesaron 500 mg de cada alga en tubos cónicos graduados y se añadieron 10 mL de agua destilada. Se agitó suavemente y se tapó con papel de aluminio. Después se dejaron reposar las muestras durante 18 h en oscuridad. Se leyó directamente el volumen ocupado por las algas en el tubo graduado. La capacidad de hinchamiento se expresó como mL ocupados/g de alga.

3.6. Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA simple con cada uno de los parámetros evaluados para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los distintos tipos de algas. Se utilizó el procedimiento LSD (least significant difference) para comprobar las diferencias a un nivel de significación del 5%. Para realizar el tratamiento de datos estadísticos se usó el programa Statgraphics Centurion XVI (Manugistics Inc., Rockville, MD, EE.UU.).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

4.1.1. Contenido en proteínas, grasa y cenizas

En la figura 4.1 se muestran los contenidos en proteína, grasa y cenizas de las algas analizadas. Los menores contenidos en proteínas los presentaron las algas espagueti de mar con un 6,8% (peso seco (p.s.)), seguida de kombu, mientras que wakame y nori presentaron valores significativamente mayores, con un porcentaje superior al 20% (p.s.). Estos resultados coinciden con otros estudios, en los que las algas rojas, como nori se han asociado a niveles altos de proteínas, mientras que las algas pardas se han relacionado con contenidos proteicos menores del 15%, excepto la wakame que suele contener niveles mayores (Fleurence, 1999; Kumar et al., 2015; Kunio y Takahisa, 2000; Peinado et al., 2014; Sánchez-Machado et al., 2004). Sin embargo, hay estudios en los que los contenidos proteicos de espagueti de mar y kombu fueron superiores (Gómez-Ordóñez et al., 2010). Esta diferencia se podría deber a la variabilidad existente a lo largo del año en la composición de las algas.

Se puede afirmar que las algas estudiadas, principalmente nori y wakame son una fuente importante de proteínas, que pueden ser comparadas con algunos vegetales con altos contenidos proteicos.

Teniendo en cuenta que el pescado es un alimento altamente proteico, el objetivo de adicionar algas en la formulación de productos de la pesca (hamburguesas, salchichas y patés de pescado y algas), no es el de aumentar el contenido proteico o mejorar el valor biológico de sus proteínas. Sin embargo, el hecho de que estas algas presenten niveles altos de proteínas indica que el empleo de las mismas permite mantener el valor nutricional del pescado, ya que no disminuye el contenido proteico final en el producto elaborado. De hecho, las hamburguesas desarrolladas con pescado y algas, mantuvieron un contenido proteico similar al del pescado empleado como materia prima (Penalba, 2014).

El contenido en lípidos varió entre un 0,08 % (nori) hasta un 1,1% (wakame), lo que demuestra el bajo aporte calórico de las algas. Aunque el contenido en grasa es muy bajo, hay que destacar que las algas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, tal y como ha sido demostrado en otros estudios (Peinado et al., 2014; Sánchez-Machado et al., 2004). Este bajo aporte lipídico junto con el excelente perfil de ácidos grasos es otra ventaja de las algas para ser empleadas como ingrediente en productos de la pesca. En un estudio llevado a cabo en pasta, la adición de wakame aumentó los niveles de ácidos grasos ω -3, mejorando la calidad nutricional de la misma (Prabhasankar et al., 2009).

En cuanto a la cantidad de cenizas, las 4 muestras presentaron valores significativamente diferentes, variando entre un 24 y un 34% (figura 4.1), tal y como se ha encontrado en otros trabajos (Rupérez, 2002). El alga nori es la que presentó el contenido más bajo en cenizas, lo que coincide con otros estudios que ponen de manifiesto que las algas rojas contienen menores contenidos de cenizas que las pardas (Kumar et al., 2015; Rupérez, 2002). Las cenizas constituyen la segunda fracción mayoritaria después de la fibra alimentaria, tal y como han comentado otros autores (Gómez-Ordóñez et al., 2010; Cofrades et al., 2008). Esto es debido a

que las algas son muy ricas en minerales, tales como Na, K, Ca, Mg, (que se comentan más adelante), P, Fe y también contienen iodo, iones cloruros y sulfatos.

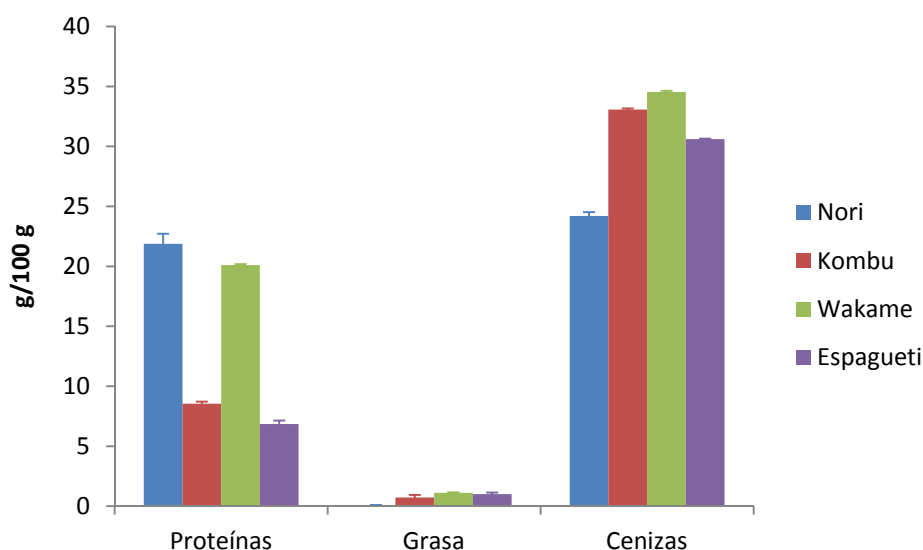


Figura 4.1. Contenido en proteínas, grasa y cenizas de las algas en polvo, expresado en g/100 g (peso seco). (Valor medio y desviación estándar (barras de error), n=3).

4.1.2. Contenido en fibra dietética total

En la tabla 4.1 se muestran los contenidos en fibra de las muestras analizadas. Cabe destacar los altos contenidos en fibra total que presentaron las 4 algas estudiadas. El alga kombu presentó el valor significativamente más alto, con un aporte cercano al 45%. Esta especie de alga es una de las que mayor contenido en fibra aporta.

Tabla 4.1. Contenido en fibra dietética total de las algas en polvo, expresado en g/100 g (peso seco). (Valor medio \pm desviación estándar, n=2).

Alga	Fibra (g/100 g)
Nori	34,8 \pm 0,8 ^a
Kombu	44,8 \pm 0,5 ^c
Wakame	38,8 \pm 0,5 ^b
Espagueti de mar	38,3 \pm 0,4 ^b

Letras iguales indican la pertenencia a grupos homogéneos.

Nivel de significación (p-valor): ***p<0,001

Algunos estudios han demostrado que el contenido en fibra soluble es mayor en las algas rojas, como nori, mientras que las algas pardas tienen un mayor contenido en fibra insoluble (Dawczynski et al., 2007; Holdt y Kraan, 2011; Murata y Nakazoe, 2001). Hay que destacar que

la ingestión diaria de fibra recomendable es del orden de 25-30 g/día (FAO, 2015), siendo la proporción recomendada del 25-35% de fibra soluble y 70-75% de fibra insoluble. Teniendo en cuenta estos datos, las 3 algas pardas evaluadas aportarían un mayor beneficio que la nori. Aunque en este estudio no se ha determinado la proporción de fibra soluble y fibra insoluble.

Estos datos confirman el aporte de fibra que supone la incorporación de algas a productos alimenticios pobres en fibra o con contenidos nulos, como podrían ser los productos derivados de la carne y el pescado.

En los productos desarrollados en el laboratorio comentados anteriormente (hamburguesas, patés y salchichas de pescado con algas), teniendo en cuenta los datos de fibra obtenidos en este trabajo, el aporte de fibra de las algas por 100 g de alimento sería el siguiente:

- Hamburguesas: Aporte de 2,8 g de fibra/100 g (formulación: 94% de pescado, 1% kombu, 1% wakame, 3% espagueti de mar y 1% agar-agar con 80 g de fibra/100 g (Botanical-online, 2015).
- Patés: Aporte de 2,5 g de fibra/100 g (formulación: 69% pescado, 12,5% de agua, 12,5% de aceite, 2% nori, 2% kombu, 1% wakame y 1% espagueti de mar)
- Salchichas: Aporte de 2,0 g de fibra/100 g (formulación: 67% pescado, 20% de agua, 4% de aceite, 1% sal, 4% fécula, 0,5% nori, 0,5% kombu, 0,5% wakame, 1,5% espagueti de mar y 1% agar-agar)

Cabe destacar que el Reglamento 1924/2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos (Comisión Europea, 2006), establece que *“solamente podrá declararse que un alimento es fuente de fibra, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene como mínimo 3 g de fibra por 100 g o, como mínimo, 1,5 g de fibra por 100 kcal”*. En los productos desarrollados no se llega a alcanzar este valor, pero, en el caso de las hamburguesas el aporte es muy cercano. En los 3 productos desarrollados, la inclusión de algas supone un valor añadido por el alto contenido en fibra que aportan al producto final.

4.1.3. Contenido en aminoácidos

Se identificaron los 15 aminoácidos que aparecen en la tabla 4.2. Se cuantificaron todos, excepto la glicina porque no se obtuvo una respuesta lineal en la curva de calibrado, a las concentraciones empleadas, por lo que para cuantificarlo será necesario volver a preparar una recta de calibrado empleando un rango de concentraciones más pequeño, cercano a las concentraciones de los extractos de las muestras.

El contenido de los aminoácidos cuantificados se muestra en la figura 4.2. Los aminoácidos Asn y Ser aparecían en el mismo tiempo de retención, por lo que los picos estaban solapados y no se pudieron cuantificar por separado. Lo mismo sucedió con His y Thr, y con Leu y Phe (tabla 4.2). Por ello, la concentración se expresa como suma de ambos analitos. Son necesarias más pruebas para optimizar el método de separación y poder cuantificarlos por separado de una forma más exacta.

En la figura 4.2.a, se ha expresado el contenido en aminoácidos en mg aminoácido/g de muestra. Se observa que, en general, las concentraciones de nori y wakame fueron significativamente mayores al resto. Espaguete de mar fue la que menor cantidad de aminoácidos presentó, seguida de kombu. Esto es debido a la diferencia existente en los contenidos de proteínas. Como se ha explicado anteriormente, kombu y espaguete de mar presentaron contenidos proteicos inferiores al 10%, mientras que en las dos restantes se superó el 20%.

Tabla 4.2. Aminoácidos identificados en las algas, junto con su abreviatura y tiempo de retención (t_R).

Aminoácido	Abreviatura	t_R (min)
Ácido aspártico	Asp	1,51
Ácido glutámico	Glu	1,75
Asparagina	Asn	3,68
Serina	Ser	3,71
Histidina	His	5,75
Treonina	Thr	5,80
Arginina	Arg	9,40
Alanina	Ala	9,55
Tirosina	Tyr	12,97
Glicina	Gly	14,59
Valina	Val	15,07
Isoleucina	Ile	15,80
Leucina	Leu	20,19
Fenilalanina	Phe	20,21
Lisina	Lys	22,70

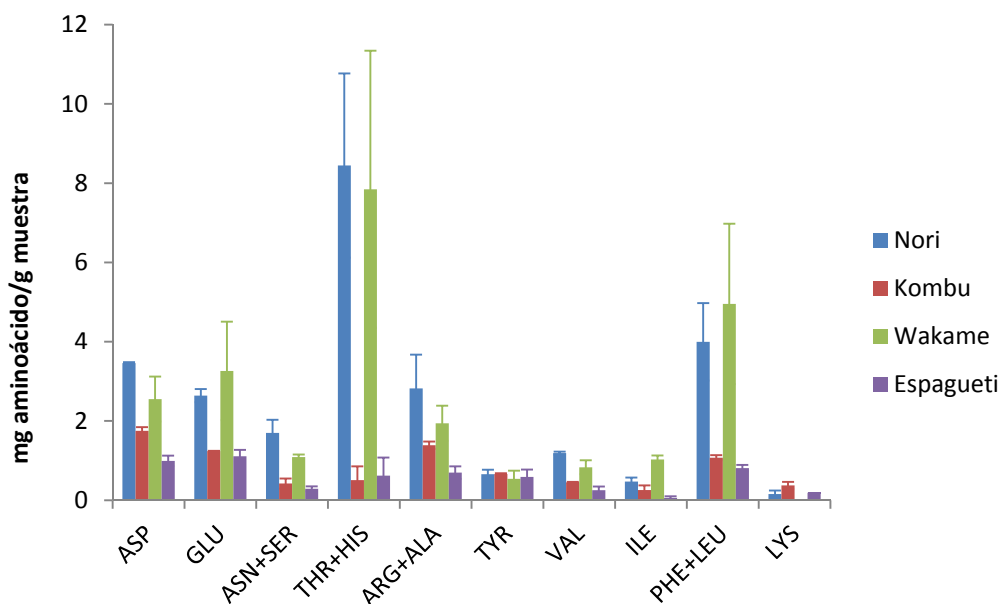
En la figura 4.2.b, el contenido en aminoácidos se ha referido al peso de proteína, de forma que se puede observar las diferencias en la composición de aminoácidos de las proteínas de las algas. En las 4 muestras, las concentraciones de ácido aspártico y glutámico fueron muy altas. Estos dos aminoácidos se han relacionado con el sabor umami, por lo que tendrían un papel muy importante en el empleo de algas como potenciadores del sabor. En otros trabajos, también se han encontrado altos valores de estos dos aminoácidos, llegando a suponer el 26% de los aminoácidos totales de algunas algas (Dawczynski et al., 2007; Peinado et al., 2014; Syad et al., 2013). Se pueden apreciar que las algas estudiadas contenían aminoácidos esenciales, como valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, arginina, etc., lo que demuestra la alta calidad de las proteínas de las mismas. En un estudio llevado a cabo en pasta, se demostró la mejora en el perfil de aminoácidos al incluir el alga wakame en la formulación (Prabhasankar et al., 2009).

En general, los valores de los aminoácidos obtenidos en este estudio son del mismo orden que los dados por otros autores en diferentes especies de algas, salvo en el caso de la suma de aminoácidos Thr+His y de la Phe+Leu. En ambos casos, se pueden observar valores especialmente elevados en nori y wakame. Como ya se ha explicado, es necesario cuantificar

por separado los aminoácidos que aparecen solapados, para tener una medida más exacta de las concentraciones.

Los resultados obtenidos en este apartado ponen de manifiesto que las 4 algas, y muy especialmente nori y wakame son una fuente importante de aminoácidos.

(a)



(b)

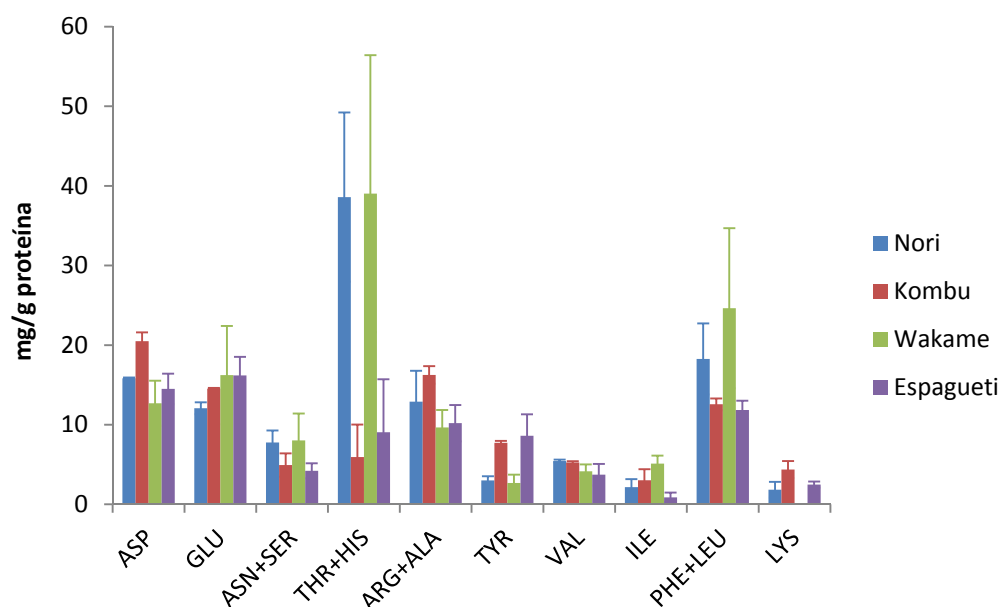


Figura 4.2. Contenido en aminoácidos totales, expresado en (a) mg aminoácido/g muestra (peso seco) (b) mg aminoácido/g proteína. (Valor medio y desviación estándar (barras de error), n=2). (Nombre completo de las abreviaturas en tabla 4.2).

4.1.4. Contenido en Na, K, Ca y Mg, y en cloruros

Contenido en cationes

En la figura 4.3 se muestra el cromatograma de una de las muestras (kombu), obtenido en el análisis de cationes.

La figura 4.4 muestra los contenidos en los cationes analizados. Los contenidos de sodio fueron elevados, mostrando el alga wakame un valor significativamente mayor al resto. Sin embargo, el contenido en potasio de esta alga fue muy bajo, mientras que el resto, especialmente kombu y espagueti presentaron contenidos en potasio muy altos.

Es interesante ver la relación Na/K que presentaron las algas, ya que, desde el punto de vista nutricional, es muy importante que esta relación sea baja, ya que dietas ricas en sodio o con alta relación Na/K se han relacionado con problemas de hipertensión y otras enfermedades (Rupérez, 2002). Las relaciones Na/K fueron 1,3; 0,2; 9,5 y 0,42 para nori, kombu, wakame y espagueti de mar, respectivamente. Con la excepción de wakame, estas algas presentan una excelente relación sodio/potasio. El bajo valor de K encontrado en wakame no se ha podido correlacionar con otros estudios llevados a cabo en este alga, donde se obtuvieron valores superiores al 8% (Rupérez, 2002).

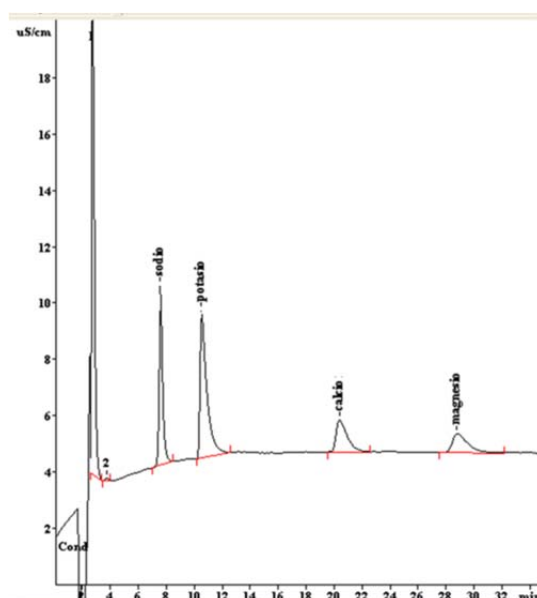


Figura 4.3. Cromatograma de una muestra de algas (kombu) obtenido en el análisis de cationes.

En España se consume más sodio del recomendado por la Organización Mundial de la Salud (5 g de sal). Por ese motivo, la reducción del consumo de sal de 9,8 a 5 g es un objetivo prioritario dentro de la Estrategia NAOS (Estrategia para la Nutrición, Actividad física y Prevención de la Obesidad) presentada por el Ministerio de Sanidad y Consumo, a través de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Para alcanzar esta meta, entre otras acciones, Sanidad solicitó a las industrias disminuir el contenido en sal de los productos elaborados, ya

que éstos constituyen la principal fuente de sodio en la dieta. Algunas de las estrategias estudiadas para reducir el sodio en alimentos procesados, son la sustitución parcial de Na por K o el uso de potenciadores de sabor. En este sentido, la incorporación de algas a estos productos puede ser muy interesante, ya que presentan un alto contenido en potasio junto con los aminoácidos y otros compuestos que pueden actuar como potenciadores del sabor, lo que podría permitir la disminución de la cantidad de sal, sin detrimento de la calidad organoléptica.

Respecto a los contenidos de calcio, no se observaron diferencias significativas entre las distintas muestras. Cabe destacar que las algas también son una fuente importante también de Ca. En relación al magnesio, wakame presentó un contenido significativamente superior al resto. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios (Rupérez, 2002).

Si se compara la suma global de estos 4 minerales (nori: 6,2%; kombu: 10,8%; wakame: 7,6%; espagueti: 11,0%) con los encontrados en distintos vegetales terrestres como zanahorias (3,3%), tomates (3,4%) o maíz dulce (1,3%) (USDA, 2001 citado por Rupérez, 2002), las algas presentan un mayor porcentaje, como se ha visto en otros estudios (Rupérez, 2002).

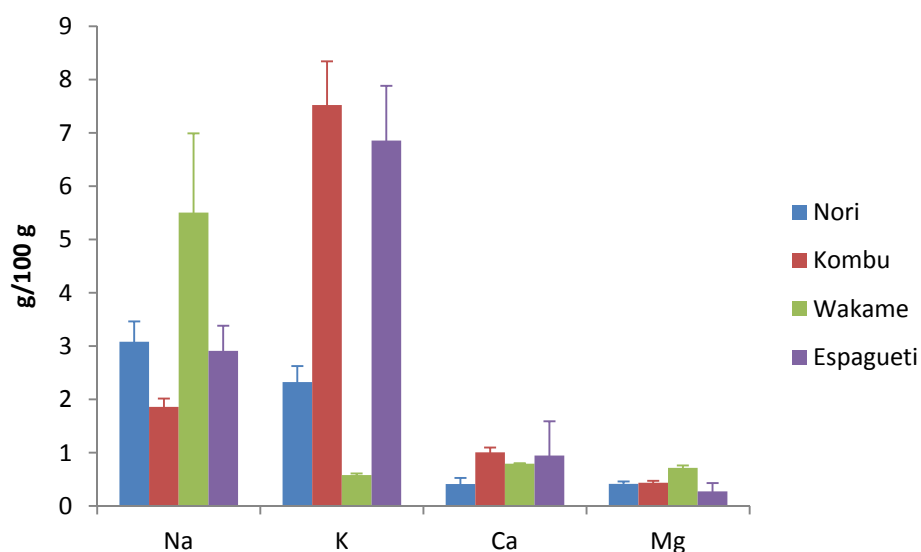


Figura 4.4. Contenido en Na, K, Ca y Mg, expresado en g/100 g (peso seco). (Valor medio y desviación estándar (barras de error), n=3).

Las algas estudiadas en este trabajo suponen un aporte importante de minerales. La incorporación de estas algas en los alimentos podría ayudar a conseguir la ingesta diaria recomendada de minerales esenciales, a la vez que podría suponer una interesante alternativa para la reducción de sal, como ya se ha comentado. En las hamburguesas de pescado desarrolladas por el grupo de investigación (Penalba, 2014), la incorporación de estas algas evitó el uso de sal como ingrediente.

Contenido en cloruros

Los aniones mayoritarios de las algas son sulfatos y cloruros. En la tabla 4.3 se muestra el contenido en el ión cloruro.

Tabla 4.3. Contenido en cloruros de las algas en polvo, expresado en g/100 g alga (peso seco) (valor medio \pm desviación estándar, n=3), y en g/100 g cenizas.

Alga	Cl ⁻ (g/100 g alga)	Cl ⁻ (g/100 g cenizas)
Nori	7,86 \pm 0,09 ^a	32,45
Kombu	8,5 \pm 0,1 ^b	25,66
Wakame	9,88 \pm 0,07 ^c	28,59
Espaguete de mar	10,4 \pm 0,2 ^d	33,85

Letras iguales indican la pertenencia a grupos homogéneos.

Nivel de significación (p-valor): ***p<0,001

El menor contenido en cloruros lo presentó el alga nori, lo que coincide con algunos estudios donde se establece que las algas rojas presentan un menor contenido de este anión que las pardas, debido a que las rojas suelen vivir en aguas más profundas con menor nivel de salinidad. Sin embargo, si referimos los niveles del ión cloruro al porcentaje que aportan a las cenizas, kombu y wakame presentaron un menor aporte de cloruros a las cenizas que nori. Espaguete de mar fue el alga que mayor contenido de cloruro y mayor aporte a las cenizas supuso (33,85%), lo que coincide con otros estudios, donde las algas pardas han alcanzado niveles de cloruros en cenizas hasta de 33-37% (Gómez-Ordóñez et al., 2010).

4.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

4.2.1. Compuestos fenólicos totales (CFT)

En la figura 4.5 se muestran los resultados obtenidos en el extracto etanólico (extracción en una etapa con etanol) y en el extracto metanólico (1ª extracción con mezcla de metanol/agua y 2ª extracción con mezcla de acetona/agua). Cabe destacar que la extracción de compuestos fenólicos fue mayor en el extracto metanólico. Esto es debido a la influencia del disolvente en la selectividad de los compuestos fenólicos. Hay numerosos estudios que comparan la extracción con agua frente a la extracción con disolvente orgánicos polares, como metanol o etanol, siendo, en general, inferior la concentración de CFT en los extractos acuosos (Farvin y Jacobsen, 2013; Jiménez-Escrig et al., 2011; Wang et al., 2009). Además de la influencia del disolvente, las diferencias halladas en este trabajo podrían deberse a que en el extracto metanólico, se emplearon dos etapas, por lo que es lógico que el rendimiento de extracción

fuera mayor. No obstante, las diferencias fueron significativas solo en el caso de nori ($p < 0,001$) y espagueti de mar ($p < 0,01$).

En la extracción con etanol, los valores oscilaron entre 0,46 y 2,91 mg ácido gálico (GAE)/g de muestra. Estos resultados están dentro del rango de valores obtenidos para distintos tipos de algas en extracto etanólico (Farvin y Jacobsen, 2013). En este caso, la muestra que presentó valores significativamente más altos fue espagueti de mar, seguida de wakame, kombu y nori.

En el extracto metanólico, no existieron diferencias significativas entre las algas nori, kombu y wakame (valores entre 1,7 - 2,9 mg GAE/g); sin embargo, cabe destacar el alto contenido obtenido en espagueti de mar (18,24 mg GAE/g), que fue significativamente mayor al resto. En otros estudios llevados a cabo con distintas algas pardas y rojas, se obtuvieron también altos valores en espagueti de mar (en torno a 30 mg GAE/g) (Jiménez-Escrig et al., 2011).

Las algas son una fuente importante de compuestos fenólicos, como se evidencia en este y otros estudios. La proporción de este tipo de compuestos varía de forma importante entre diferentes especies de algas. Algunos autores han puesto de manifiesto que las algas rojas y verdes tienen menores niveles de compuestos fenólicos que las algas pardas (Jiménez-Escrig et al., 2011; Kumar et al., 2015). En este estudio el alga roja estudiada (nori), solo presentó valores significativamente inferiores en el extracto etanólico.

Por otra parte, también se ha visto una gran variabilidad dentro de una misma especie, ya que los CFT se ven altamente afectados por factores medioambientales (luz, salinidad, temperatura, ...). Esto es debido a que las algas sintetizan estos compuestos para protegerse en condiciones de estrés, como puede ser frente a radiaciones ultravioleta (Connan et al., 2007; Kumar et al., 2015; O'Sullivan et al., 2011).

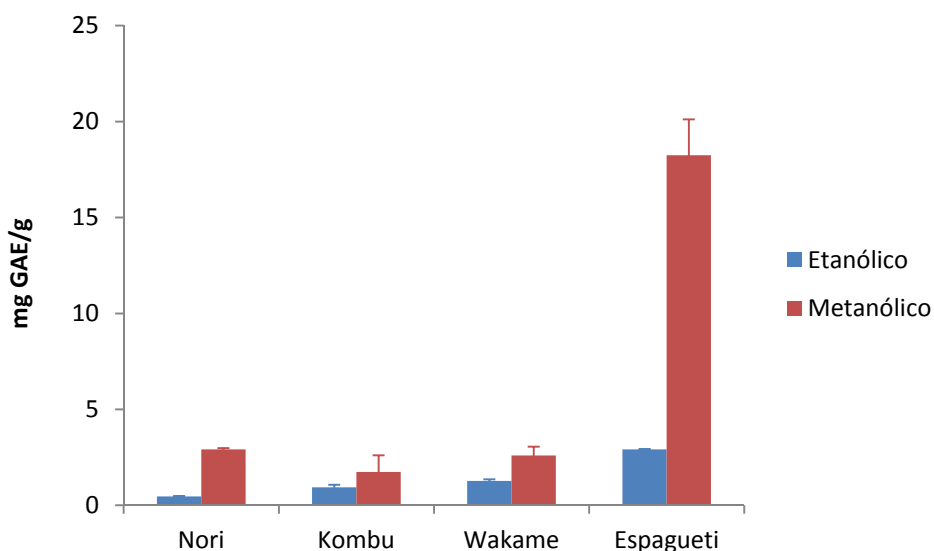


Figura 4.5. Contenido en compuestos fenólicos totales, expresado en mg de ácido gálico (GAE)/g (peso seco). (Valor medio y desviación estándar (barras de error), $n=3$).

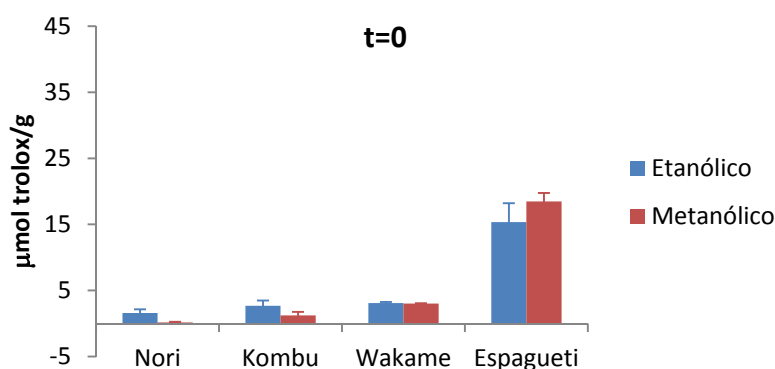
4.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante

Tal y como se ha comentado, la capacidad antioxidante de un alimento se debe a diferentes tipos de compuestos con mecanismos de acción muy variados y que además pueden interactuar sinérgicamente. Por ello, para evaluar la capacidad antioxidante en este estudio se emplearon dos de los métodos más ampliamente utilizados en alimentos: el método del FRAP y el método del ABTS.

4.2.2.1. Método del FRAP

Este método mide el poder reductor de los compuestos. Se basa en la reducción de Fe^{3+} , formándose un complejo coloreado (TPTZ-Fe^{2+}), cuya absorbancia se mide a 595 nm, como se ha comentado en el apartado de Material y Métodos. Se midió a tiempo 0 y transcurridos 30 min, y se expresó como μmol de trolox/g de muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.6.

(a)



(b)

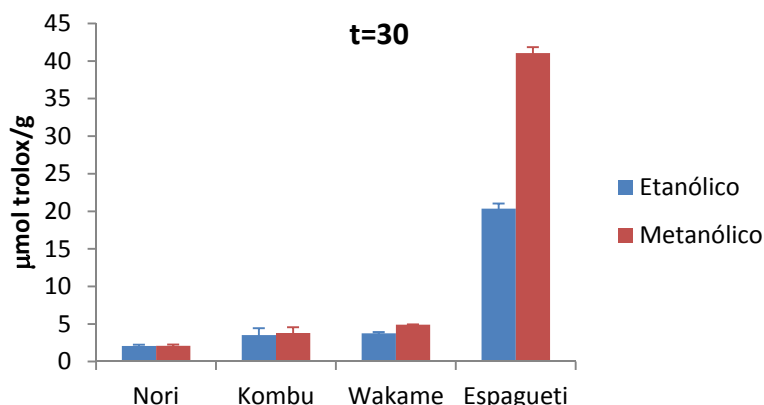


Figura 4.6. Capacidad antioxidante obtenida por el método FRAP (a) medida a tiempo 0 y (b) medida a tiempo 30 min, expresada en μmol de trolox/g (peso seco). (Valor medio y desviación estándar (barras de error), n=3).

La capacidad antioxidante fue mayor a los 30 min, en prácticamente todas las muestras. Al igual que sucedía con los CFT, las algas extraídas con metanol/agua/acetona (extracto metanólico) presentaron mayor capacidad antioxidante que las extraídas con etanol. Por ello, se podría concluir que de los dos métodos de extracción empleados, el método que emplea etanol en una sola etapa podría ser descartado.

Hay que destacar el alto valor de capacidad antioxidante que presentó espagueti de mar, siendo muy diferente al resto de las algas estudiadas. Esto coincide con los mayores valores de CFT comentados en el apartado anterior, ya que son compuestos antioxidantes que contribuyen a la alta capacidad antioxidante de las algas.

4.2.2.2. Método del ABTS

Este método mide el poder de los compuestos para secuestrar el radical ABTS⁺. Este radical es decolorado debido a la reducción por parte de los compuestos antioxidantes. Esa variación de color se registra a una longitud de onda de 658 nm. Los resultados que se presentan fueron medidos a tiempo 10 min. La capacidad antioxidante se expresó como μmol de trolox/g de muestra, al igual que por el método del FRAP.

Dado que en la determinación de CFT y de la capacidad antioxidante por el método FRAP se observó una menor eficacia con la extracción en etanol, para este método, solo se empleó la extracción con la mezcla de metanol/agua/acetona. Los resultados se muestran en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Capacidad antioxidante obtenida por el método ABTS a los 10 min, expresada en μmol de trolox/g (peso seco). (Valor medio \pm desviación estándar, n=3).

Alga	μmol de trolox/g
Nori	7,2 \pm 0,8 ^a
Kombu	12,3 \pm 0,2 ^a
Wakame	5,3 \pm 0,37 ^a
Espagueti de mar	65 \pm 6 ^b

Letras iguales indican la pertenencia a grupos homogéneos.

Nivel de significación (p-valor): ***p<0,001

Al igual que se observó en el método FRAP, el alga espagueti de mar presentó valores significativamente mayores que el resto. Nori y wakame presentaron los menores valores, siendo ambos bastante similares y kombu, ligeramente superiores, aunque sin diferencias significativas entre las 3. Estos datos coinciden con un estudio llevado a cabo en productos cárnicos, donde se incorporaban distintas proporciones de diferentes algas y se evidenció que los productos que contenían espagueti de mar presentaban la mayor capacidad antioxidante,

mientras que los que contenían nori y wakame tenían una menor concentración de trolox, siendo similar los valores entre ambas muestras (López-López et al., 2009).

De este apartado se puede concluir que las algas evaluadas poseen un importante poder antioxidante, destacando de forma notable espagueti de mar. Por ello, su adición a productos cárnicos o de la pesca podría ser una alternativa al uso de aditivos químicos, ya que representan una fuente natural de antioxidantes.

4.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Se evaluaron la capacidad de retención de aceite, la capacidad de retención de agua (WHC) y capacidad de hinchamiento (SC). La WHC y la SC se deben a las propiedades de hidratación de la fibra. La fibra soluble en contacto con el agua forma un retículo donde ésta queda atrapada, originando soluciones de gran viscosidad.

4.3.1. Capacidad de retención de aceite

En la figura 4.7 se muestra la capacidad de retención de aceite de las muestras evaluadas. Los valores encontrados fueron ligeramente superiores a los dados por otros autores en distintas especies de algas (Gómez-Ordóñez et al., 2010). Espagueti de mar fue la presentó un menor valor, mientras kombu y nori fueron las que más aceite retuvieron.

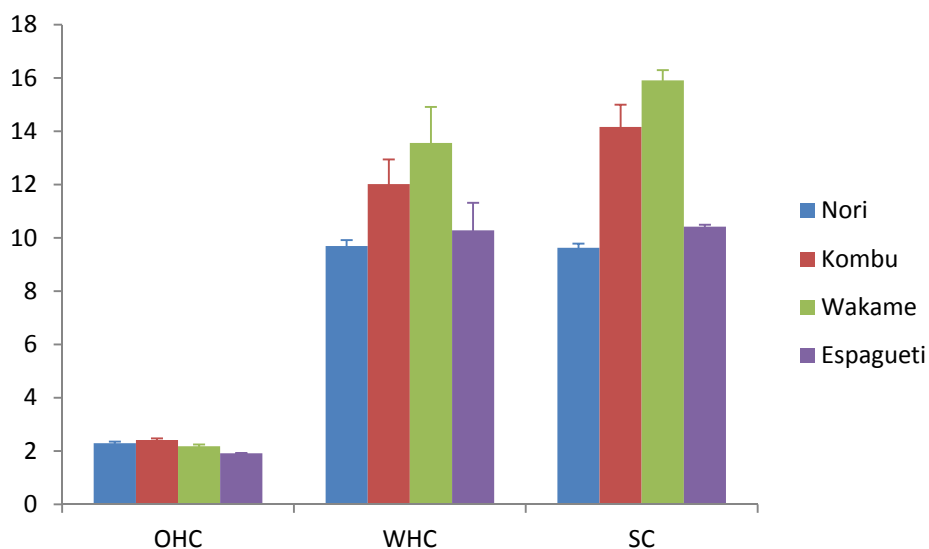


Figura 4.7. Capacidad de retención de aceite (OHC – oil holding capacity) expresada en g aceite retenidos/g alga (peso seco), capacidad de retención de agua (WHC – water holding capacity) expresada en g agua retenidos/g alga (peso seco) y capacidad de hinchamiento (SC – swelling capacity) expresada en mL/g alga (peso seco). (Valor medio y desviación estándar (barras de error), n=3).

4.3.2. Capacidad de retención de agua

La WHC más elevada la presentó wakame, seguida de kombu (figura 4.7). En este caso, también los valores obtenidos fueron ligeramente superiores a los hallados en otros estudios (Gómez-Ordóñez et al., 2010).

Al igual que la capacidad de retención de aceite, este parámetro tiene gran importancia desde el punto de vista tecnológico, ya que afecta directamente a la textura. Se han llevado a cabo varios estudios con algunas algas como wakame, nori o espagueti de mar en productos cárnicos, observándose una mejora en las propiedades de ligado de aceite y de agua, mejorando así también la textura (López-López et al., 2009; Cofrades et al., 2008). Esto hace que sea muy interesante su inclusión en las formulaciones de hamburguesas, patés y salchichas de pescado.

4.3.3. Capacidad de hinchamiento

La capacidad de hinchamiento está relacionada con la WHC, por lo que wakame presentó el mayor valor de este parámetro, seguido de kombu y, por último espagueti y nori, no siendo las diferencias entre ambas significativas. En la figura 4.6 se muestra una foto de las algas al finalizar el tiempo de ensayo (18 h).

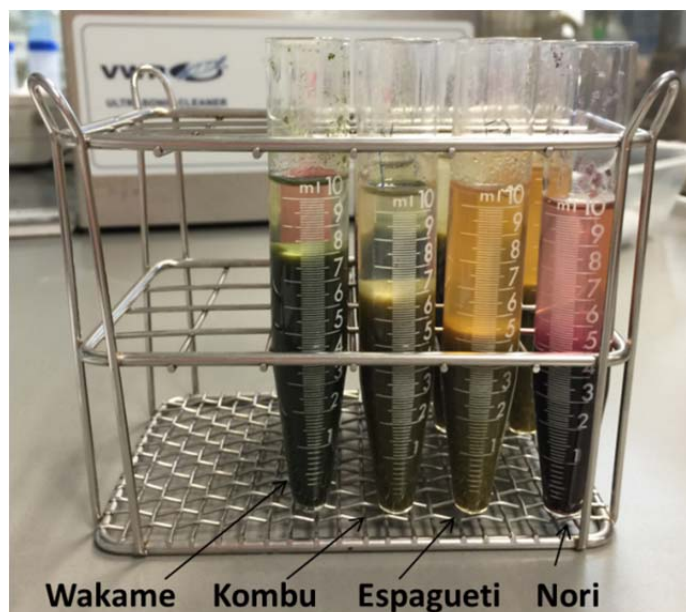


Figura 4.8. Algas hidratadas durante 18 h para la determinación de la capacidad de hinchamiento.

Se puede concluir que estas propiedades hacen que las algas tengan interés en la industria alimentaria, no solo desde el punto de vista nutricional, como ya se ha comentado, sino también desde el tecnológico, ya que podrían sustituir a algunos aditivos como fosfatos y otros compuestos que se han empleado para mejorar la textura y jugosidad de carnes y pescados. Esto hace que las 4 algas evaluadas jueguen un papel importante en las formulaciones de

hamburguesas, patés y salchichas de pescado, desarrolladas por el grupo de investigación, ya que permitirían obtener productos de textura adecuada sin presentar exudados de agua y/o aceite.

5. CONCLUSIONES

Las 4 algas, principalmente nori y wakame, presentan altos contenidos en proteínas. Cabe destacar el contenido de todas las algas en aminoácidos esenciales, así como el alto contenido en ácido aspártico y glutámico (relacionados con el sabor umami), con un papel muy importante en el empleo de algas como potenciadores del sabor.

Las 4 algas suponen un aporte importante de minerales y un bajo aporte calórico, que se refleja en sus altos contenidos en cenizas y sus bajos contenidos en lípidos.

Todas las especies estudiadas en este trabajo presentan valores importantes de Na, K, Ca, Mg y cloruros. La relación Na/K es especialmente baja en kombu y espagueti de mar, por lo que su incorporación en ciertos alimentos es una buena alternativa para reducir la cantidad de sodio en alimentos procesados.

Los contenidos en fibra de todas las algas evaluadas son muy altos, destacando kombu. Su incorporación en productos de la pesca supondría un aporte importante de fibra, lo que mejoraría el valor nutricional del pescado.

Las algas evaluadas, especialmente espagueti de mar, son una fuente natural de antioxidantes, lo que queda demostrado por los altos contenidos en compuestos fenólicos totales y sus altos valores de capacidad antioxidante. Esto hace que las algas puedan sustituir a los antioxidantes sintéticos empleados comúnmente.

Las 4 algas presentan propiedades importantes de retención de aceite y de agua, destacando el alga wakame, que también presenta la mayor capacidad de hinchamiento. Estas algas pueden sustituir a algunos aditivos químicos empleados para mejorar la textura y jugosidad.

La incorporación de las algas en los productos de la pesca implicaría un valor añadido en el pescado, ya que no se vería reducido el contenido proteico, aportando minerales y fibra sin aumentar el valor calórico del producto. Asimismo, la incorporación de estas algas podría emplearse para reducir el contenido de Na en el producto final y evitar el uso de algunos aditivos químicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

ALBALAT, V. (2015). Estudio de nuevas formulaciones para la obtención de patés a base de pescado y algas. Trabajo Fin de Grado. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València.

A.O.A.C. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS) (1997). Official Methods of Analysis, 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA.

BARROW, C.; SHAHIDI, F. (2008). *Marine nutraceuticals and functional foods*. Editorial CRC Press. New York. 512 pp.

BELUGAH, S.; RAMOGAJEC, A. (2011). Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chemistry*, 124(3), 1076-1082.

BOTANICAL-ONLINE (2015). *Propiedades alimentarias del agar-agar*, visto el 25 de agosto de 2015 http://www.botanical-online.com/propiedadesagar_agar.htm.

CHANDINI, S.K.; GANESAN, P.; BHASKAR, N. (2008). In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry*, 107, 707-713.

CHANG, H.C.; WU, L.C. (2008). Texture and quality properties of Chinese fresh egg noodles formulated with green seaweed (*Monostroma nitidum*) powder. *Journal of Food Science*, 73, S398-S404.

CHEW, Y.L.; LIM, Y.Y.; OMAR, M.; KHOO, K.S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1067-1072.

COFRADES, S.; LÓPEZ-LÓPEZ, I.; SOLAS, M.T.; BRAVO, L.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. (2008). Influence of different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low-salt gel/emulsion meat systems. *Meat Science*, 79, 767-776.

COMISIÓN EUROPEA (2006). Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.

COMISIÓN EUROPEA (2009). Reglamento (CE) nº 152/2009 de la Comisión de 27 de enero de 2009 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos.

CONCHA-HERRERA, V.; LERMA-GARCÍA, M.J.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M.; SIMÓ-ALFONSO, E.F. (2010). Classification of vegetable oils according to their botanical origin using amino acid profiles established by High Performance Liquid Chromatography with UV-vis detection: A first approach. *Food Chemistry*, 120, 1149-1154.

CONNAN, S.; DESLANDES, E.; AR GALL, E. (2007). Influence of day-night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 349, 359-369.

- COULIER, L.; HEKMAN, B.R.; VAN DER WERFF, B.J.C.; BURGERING, M.; THISSEN, U. (2011). Comprehensive analysis of umami compounds by ion-pair liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Food Science*, 76(7), C1081-C1087.
- COX, S.; ABU-GHANNAM, N; GUPTA, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal*, 17,205-220.
- DAWCZYNSKI, C.; SCHUBERT, R.; JAHREIS, G. (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*, 103(3), 891-899.
- ELLEUCH, M., BEDIGIAN, D., ROISEUX, O., BESBES, S., BLECKER, C., & ATTIA, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124(2), 411-421.
- FOODStuff SA (2015). *Food Trends 2015*, visto el 25 de julio de 2015, <http://www.foodstuffsa.co.za/food-trends/food-trends-2015/3881-naturally-functional-remains-the-king-of-food-bev-trends>.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION) (2015). *Necesidades Nutricionales 2*, visto el 10 de agosto de 2015 <http://www.fao.org/docrep/014/am401s/am401s03.pdf>
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION) (2007). Year book of fishery statistics 2005 (Vol. 100-1/2). *Food and Agricultural Organization*.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION) (2010). *El estado mundial de la pesca y la agricultura*, visto el 31 de julio de 2015 <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s01.pdf>
- FARVIN, S.K.H.; JACOBSEN, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138, 1670-1681.
- FLEURENCE, J. (1999). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 25-28.
- FLEURY, N., & LAHAYE, M. (1991). Chemical and physico-chemical characterisation of fibres from *Lamaria digitata* (Kombu Breton): physiological approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55, 389-400.
- FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.
- GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E. (2013). Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles. Estudios in vitro e in vivo. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. (2010). Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Research International*, 43, 2289-2294.
- HOLDT, S.; KRAAN, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed; functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3). 543-597.

- JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; RUPÉREZ, P. (2011). Brown and red seaweeds as potential sources of antioxidant nutraceuticals. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1123-1132.
- JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. (2000). Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical and effects on cholesterol metabolism. *Nutrition Research*, 20(4), 585-598.
- JOHNSON, E.; STEVENSON, R. (1978). *Quantitative analysis in basic liquid chromatography*. Varian Associates Inc. Hansen Way, Palo Alto, CA. 223 pp.
- KIM, H.W.; CHOI, J.H.; CHOI, Y.S.; HAN, D.J.; KIM, H.Y.; LEE, M.A. (2010). Effects of Sea Tangle (*Lamina japonica*) powder on quality characteristics of breakfast sausages. *Korean Journal of Food Science and Animal Resource*, 30, 55-61.
- KUMAR, S.; SAHOO, D.; LEVINE, I. (2015). Assessment of nutritional value in a brown seaweed *Sargassum wightii* and their seasonal variations. *Algal Research*, 9, 117-125.
- KUNIO, S.; TAKAHISA, N.; (2000). Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(9), 450-454.
- LÓPEZ-LÓPEZ, I.; BASTIDA, S.; RUIZ-CAPILLAS, C.; BRAVO, L.; LARREA, M.T.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.; COFRADES, S.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. (2009). Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Science*, 83, 492-498.
- MORRIS, W.L.; ROSS, H.; DUCREUX, L.; BRADSHAW, J.; BRYAN, G.; TAYLOR, M. (2007). Umami compounds are a determinant of the flavor of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9627-9633.
- MURATA, M.; NAKAZOE, J. (2001). Production and use of marine algae in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 35(4), 281-290.
- ORUÑA-CONCHA, M.J.; METHVEN, L.; BLUMENTHAL, H.; YOUNG, C.; MOTTRAM, D. (2007). Differences in glutamic acid and 5'ribonucleotide contents between flesh and pulp of tomatoes and the relationship with Umami Taste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5776-5780.
- O'SULLIVAN, A.M.; O'CALLAGHAN, Y.C.; O'GRADY, M.N.; QUEGUINEUR, B.; HANNIFFY, D.; IROY, D.J.; KERRY, J.P.; O'BRIEN, N.M. (2011). *In vitro* and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. *Food Chemistry*, 126, 1064-1070.
- PEINADO, I.; GIRÓN, J.; KOUTSIDIS, G.; AMES, J.M. (2014). Chemical composition, antioxidant activity and sensory evaluation of five different species of brown edible seaweeds. *Food Research International*, 66, 36-44.
- PENALBA, V. (2014). Estudio de nuevas formulaciones para la obtención de productos de la pesca empleando algas. Trabajo Fin de Grado. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València.

- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNEIRO, M.; DÍAZ-RUBIO, M.E.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41, 274-285.
- PRABHASANKAR, P.; GANESAN, P.; BHASKAR, N.; HIROSE, A.; STEPHEN, N.; GOWDA, L.R.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K. (2009). Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. *Food Chemistry*, 115, 501-508.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396-3402.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- RUPÉREZ, P.; AHRAZEM, O.; LEAL, J.A. (2002). Potential antioxidant capacity of sulphated polysaccharides from edible brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 840-845.
- RUPÉREZ, P. (2002). Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*, 79, 23-26.
- SÁNCHEZ-ALONSO, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F.; BORDERÍAS, J. (2008). Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. *LWT-Food Science and Technology International*, 41, 42-50.
- SÁNCHEZ-MACHADO, D.I.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J.; PASEIRO-LOSADA, P. (2004). Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry*, 85, 439-444.
- SANTOSO, J.; YOSHIE, Y.; SUZUKI, T. (2002). The distribution and profile of nutrients and catechins of some Indonesian seaweeds. *Fisheries Science*, 68, 1647-1648.
- SIRVENT, P. (2015). Desarrollo y caracterización de nuevas salchichas de pescado y algas. Trabajo Fin de Grado. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València.
- SYAD, A.N.; SHUNMUGIAH, K.P.; KASI, P.D. (2013). Seaweeds as nutritional supplements: Analysis of nutritional profile, physicochemical properties and proximate composition of *G. acerosa* and *S. wightii*. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3, 139-144.
- TASKIN, E.; OZTURK, M.; TASKIN, E.; KURT, O. (2007). Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African Journal of Biotechnology*, 6, 2746-2751.
- WANG, T.; JÓNSDÓTTIR, R.; ÓLAFSDÓTTIR, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116, 240-248.
- YOSHIE-STARK, Y.; HSIEH, Y.P.; SUZUKI, T. (2003). Distribution of flavonoids and related compounds from seaweed in Japan. *Journal of the Tokyo University of Fisheries*, 89, 1-6.