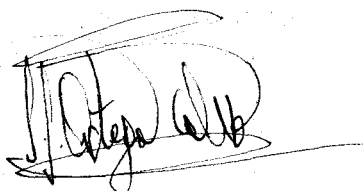


UNIVERSIDAD DE SEVILLA

R. 9418

**EVALUACION NUTRICIONAL Y TOXICOLOGICA DE ALGAS COMESTIBLES:
COMPOSICION QUIMICA.**

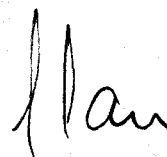
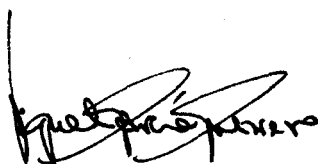
Memoria presentada para optar al Grado de Doctor
en Ciencias Biológicas por
JOSE JULIO ORTEGA CALVO



Sevilla, junio de 1991.

VºBº El Tutor

VºBº El Director



Fdo./ M. García Guerrero
Catedrático de Universidad,
Departamento de Bioquímica
Vegetal y Biología Molecular,
Universidad de Sevilla.

Fdo./C. Sáiz Jiménez
Profesor de Investigación,
Consejo Superior de
Investigaciones Científicas



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para
que mi Tesis Doctoral "Evaluación Nutricional y Toxicológica
de Algas Comestibles: Composición química"

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

JOSE JULIO ORTEGA
CALVO

Sevilla, a 24 de Marzo de 1995

A mi madre
A mi hermano
A Beatriz

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 167 número 25 del libro
correspondiente. 20 MAYO 1991
Sevilla, _____

El Jefe del Negocio de Tesis,

Rosa Lafitte

El presente trabajo se ha realizado en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, durante los años 1988-1991. El autor desea expresar su sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

- Al Prof. C. Sáiz Jiménez por la dirección del presente trabajo y por su apoyo tanto material como moral durante la realización del mismo.

- A la Dra. C. Mazuelos por su inestimable colaboración en la realización de los análisis inorgánicos, y por su simpatía y amabilidad en todo momento.

- A D. B. Hermosín por la ayuda prestada en la obtención de los cromatogramas de gases y de los espectros de masas.

- Al Dr. J.A. Pintor, por las facilidades prestadas durante la realización de la parte experimental del presente trabajo.

- Al Dr. J. Grimalt, del Centro de Investigación y Desarrollo de Barcelona (CSIC), por las facilidades prestadas para la realización de los análisis de C, H, N, S y de aminoácidos.

- A la Dra. M.P. de Luxán y a la Dra. M.I. Sánchez, del Instituto de la Construcción y el Cemento Eduardo Torroja de Madrid (CSIC), por el acceso al equipo de ICP-AES, y por su cordialidad y hospitalidad.

- A mi compañera Felisa Hans, por su ayuda y por su apoyo moral en todo momento.

- Al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, por la concesión de una Beca de Iniciación a la Investigación en España para la realización del presente trabajo.

INDICE

I. INTRODUCCION.....	8
II. DESCRIPCION DE LOS PRODUCTOS ESTUDIADOS.....	13
II.1. "Wakame".....	14
II.2. "Hijiki".....	16
II.3. "Dulce".....	16
II.4. "Fucus".....	17
II.5. "Chlorella".....	18
II.6. "Spirulina".....	19
III. COMPOSICION QUIMICA GENERAL DE LOS PRODUCTOS.....	23
III.1. Introducción.....	24
III.2. Resultados.....	25
III.2.1. "Wakame".....	25
III.2.2. "Hijiki".....	25
III.2.3. "Dulce".....	28
III.2.4. "Fucus".....	28
III.2.5. "Chlorella".....	29
III.2.6. "Spirulina".....	29
III.3. Discusión.....	30
III.3.1. Diferencias en la composición de macroalgas y microalgas.....	30
III.3.2. Porcentaje de humedad.....	30
III.3.3. Contenido en clorofila a.....	31
III.3.4. Proporción de ácidos nucleicos.....	31
IV. COMPOSICION MINERAL.....	33
IV.1. Introducción.....	34
IV.1.1. Distribución de los elementos en las algas.....	34
IV.1.2. Toma de metales pesados por las algas.....	36
IV.1.3. Requerimientos y niveles de toxicidad en el hombre.....	40

IV.1.4.	Legislación de niveles de metales pesados en alimentos.....	42
IV.1.5.	Técnicas analíticas.....	43
IV.2.	Resultados.....	45
IV.2.1.	"Wakame".....	56
IV.2.2.	"Hijiki".....	58
IV.2.3.	"Dulce".....	58
IV.2.4.	"Fucus".....	59
IV.2.5.	"Chlorella".....	60
IV.2.6.	"Spirulina".....	62
IV.3.	Discusión.....	63
IV.3.1.	Análisis por ICP-AES.....	63
IV.3.2.	Relación entre log x y log y.....	65
IV.3.3.	Contenido en C, H, O, N y S.....	66
IV.3.4.	Minerales y electrolitos.....	67
IV.3.5.	Elementos traza.....	72
IV.3.6.	Metales pesados.....	75
V.	HIDRATOS DE CARBONO: AZUCARES NEUTROS.....	78
V.1.	Introducción.....	79
V.1.1.	Polisacáridos de reserva.....	79
V.1.2.	Polisacáridos estructurales.....	80
V.1.3.	Papel de los hidratos de carbono en la dieta humana.....	82
V.2.	Resultados.....	83
V.2.1.	"Wakame".....	83
V.2.2.	"Hijiki".....	93
V.2.3.	"Dulce".....	93
V.2.4.	"Fucus".....	93
V.2.5.	"Chlorella".....	94
V.2.6.	"Spirulina".....	95
V.3.	Discusión.	
VI.	LIPIDOS: ACIDOS GRASOS E HIDROCARBUROS ALIFATICOS.....	99
VI.1.	Introducción.....	100
VI.2.	Resultados.....	104
VI.2.1.	"Wakame".....	122
VI.2.2.	"Hijiki".....	123

VI.2.3. "Dulce".....	123
VI.2.4. "Fucus".....	124
VI.2.5. "Chlorella".....	125
VI.2.6. "Spirulina".....	126
VI.3. Discusión.....	129
VII. AMINOACIDOS.....	133
VII.1. Introducción.....	134
VII.2. Resultados.....	136
VII.2.1. "Wakame".....	136
VII.2.2. "Hijiki".....	136
VII.2.3. "Dulce".....	136
VII.2.4. "Fucus".....	139
VII.2.5. "Chlorella".....	139
VII.2.6. "Spirulina".....	140
VII.3. Discusión.....	140
VIII. MATERIAL Y METODOS.....	143
VIII.1. Recogida de las muestras.....	144
VIII.2. Preparación de las muestras.....	144
VIII.3. Determinación de la composición química general.....	144
VIII.3.1. Humedad.....	144
VIII.3.2. Proteína bruta.....	144
VIII.3.3. Hidratos de carbono.....	145
VIII.3.4. Lípidos.....	145
VIII.3.5. Acidos nucleicos.....	146
VIII.3.6. Clorofila a.....	146
VIII.4. Análisis elemental.....	146
VIII.4.1. Cenizas.....	146
VIII.4.2. C, H, N y S.....	146
VIII.4.3. Mineralización.....	147
VIII.4.4. Elementos mayoritarios y minoritarios.....	148
VIII.4.5. Distribución de los elementos en la macroalgas.....	148
VIII.4.6. Análisis por ICP-AES.....	148
VIII.4.6.1. Aparato y condiciones.....	148

VIII.4.6.2. Interferencias.....	149
VIII.5. Azúcares.....	149
VIII.5.1. Material y disolventes.....	149
VIII.5.2. Extracción y purificación.....	150
VIII.5.2.1. Hidrólisis.....	150
VIII.5.2.2. Neutralización.....	150
VIII.5.2.3. Formación de alditoles.....	151
VIII.5.2.4. Acetilación.....	151
VIII.5.3. Análisis por GC y GC-MS.....	152
VIII.5.4. Análisis cuantitativo.....	152
VIII.6. Acidos grasos e hidrocarburos alifáticos....	153
VIII.6.1. Material y disolventes.....	153
VIII.6.2. Extracción y saponificación.....	153
VIII.6.3. Separación.....	154
VIII.6.4. Metilación.....	154
VIII.6.5. Análisis por GC y GC-MS.....	154
VIII.6.6. Análisis cuantitativo.....	155
VIII.7. Aminoácidos.....	155
VIII.7.1. Hidrólisis.....	155
VIII.7.2. Purificación y derivati- zación.....	155
VIII.7.3. Análisis por HPLC.....	155
IX. CONCLUSIONES.....	157
X. BIBLIOGRAFIA.....	161

I. INTRODUCCION.

Las algas constituyen un grupo muy heterogéneo de organismos eucarióticos, tanto unicelulares como pluricelulares, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, y separados de las plantas superiores por la ausencia de tejidos diferenciados. En base a la composición de pigmentos fotosintéticos, al tipo de material de reserva, y a la naturaleza y disposición de los flagelos presentes en las células móviles, las algas se han clasificado en seis divisiones distintas: Chlorophyta, Euglenophyta, Chrysophyta, Pyrrophyta, Phaeophyta y Rhodophyta. Todas ellas han evolucionado de forma más o menos paralela a partir de distintos modelos de organización celular eucariótica, hasta alcanzarse en algunas de ellas un grado de desarrollo muy cercano al de las plantas. Las cianobacterias o "algas verde-azuladas" han sido tradicionalmente incluidas en las algas, aunque actualmente, debido principalmente a que son organismos procarióticos, tienden a ser consideradas como bacterias.

Las algas aparecen en casi todos los biotopos. Aunque están bien adaptadas a la vida acuática, también pueden encontrarse en hábitats terrestres, donde, por ejemplo, suponen un factor importante en la formación y agregación de los suelos. No obstante, en términos cuantitativos su contribución más importante a la biosfera la realizan como constituyentes del fitoplancton marino.

El hombre ha utilizado y utiliza hoy en día las algas para fines prácticos tan diversos como la misma diversidad biológica de estos organismos. Por ejemplo, las macroalgas marinas suponen una fuente natural importante de sustancias de aplicación industrial. Quizás las más importantes sean los extractos coloidales (también llamados ficocoloides) ácido algínico, agar y carragenano. Estos polisacáridos son ampliamente utilizados en las industrias alimentarias, farmacéuticas, textiles y cosméticas. En España, concretamente

en las costas del País Vasco y Galicia, la recogida de algas marinas para este propósito se realiza por compañías ya establecidas.

Las algas también se han utilizado como fuente de otras sustancias de interés industrial como pigmentos ¹, pesticidas ², yodo, sosa y potasa ³, o, en el caso de las diatomeas fósiles, como componente de la dinamita ³. Otros usos incluyen la depuración de aguas ⁴, el acondicionamiento y la fertilización del suelo ⁵, y la alimentación de animales ³.

Las investigaciones sobre otros posibles usos de las algas abren unas perspectivas muy amplias. Estas pasan por la producción de sustancias de uso farmacéutico (sustancias antitumorogénicas, antibióticos), sustancias de interés para la investigación, como neurotoxinas y citoquininas, o aditivos alimentarios (conservantes, colorantes) ², por el uso como fuente de energía ³, e incluso por el reciclaje de la atmósfera de las naves espaciales durante viajes de larga duración ⁶.

El presente estudio se centra en las algas comestibles. Es en los países asiáticos donde el consumo de algas como alimento se halla más difundido. Las macroalgas marinas se han consumido en Japón durante siglos, constituyendo en la actualidad un elemento cotidiano en la dieta. Por ejemplo, el 10% de los requerimientos alimentarios del ciudadano japonés se cubre con el consumo de algas marinas. Esta demanda es atendida por una industria que maneja al año unos 1.500 millones de dólares ².

En los países occidentales las algas son en general consumidas de forma minoritaria, como productos dietéticos o "sanos" ("health foods"). En este caso, la comercialización de los productos se realiza generalmente bajo una confusa o inexistente reglamentación legal, lo que implica un desconocimiento por parte del consumidor y de la administración de este tipo de productos. A esto se añade la

dificultad de acceso a las investigaciones realizadas en los países asiáticos sobre estos productos, estimuladas por su uso más difundido como alimento. El estudio de la composición química de las algas ha ocupado a gran número de investigadores de todo el mundo en los últimos 40 años, por lo que no es un problema nuevo. Si son relativamente nuevos diversos factores que pueden contribuir a modificarla, tales como contaminación ambiental y los procesos de producción, embalaje y distribución que conlleva la comercialización de los productos comestibles elaborados a partir de algas. Se hace necesario por tanto el análisis químico profundo de los productos tal como llegan al consumidor.

La solución del problema del hambre, en determinadas zonas del planeta, depende más de aspectos sociales que de la capacidad mundial de producir alimentos. No obstante, el ritmo de crecimiento de la población mundial y los procesos de desertización en algunas zonas del planeta hacen preveer que en el futuro será necesaria una explotación más eficaz de los recursos naturales disponibles, en orden a satisfacer la creciente demanda mundial de alimentos. La producción de algas para alimento por parte de los países orientales supone un ejemplo de cómo es posible aprovechar mejor los recursos naturales del planeta.

Así, el presente estudio surge, por un lado, ante un interés por este tipo de alimentación que supone una posibilidad para la nutrición de la sociedad del futuro, y, por otro, de la necesidad de conocer mejor una serie de productos comercializados en nuestro país, de un valor nutricional y propiedades toxicológicas relativamente poco conocidos.

Este estudio consiste en el análisis químico de los principales componentes de distintos productos elaborados a base de algas. En la sección II se describen los productos seleccionados, así como diversos aspectos de la biología de la especies de algas constituyentes y los procesos de producción

más comunmente utilizados y descritos en la literatura. En la sección III se incluyen los resultados de la composición química general de los productos. En las secciones IV, V, VI y VII se estudian la composición mineral, la fracción de hidratos de carbono (azúcares neutros), la fracción lipídica (ácidos grasos e hidrocarburos alifáticos) y la fracción proteica (aminoácidos), respectivamente. En la sección VIII se describen los métodos analíticos utilizados.

II. DESCRIPCION DE LOS PRODUCTOS ESTUDIADOS.

Los productos analizados en el presente trabajo fueron seleccionados después de recabar información sobre los distintos productos a base de algas comercializados en nuestro país. En general fué mucho más ágil y completa la información obtenida directamente de las marcas fabricantes que en los mismos establecimientos de venta al público. Se detectó un total de 30 productos distintos, distribuidos por 13 marcas fabricantes, aunque la búsqueda no pretendió ser exhaustiva. Estos productos se presentaban como algas secas, en polvo, en comprimidos o en cápsulas. De ellos se seleccionaron 8 productos, siguiendo criterios de presencia en un número mayor de establecimientos y de proporción de la biomasa algal en el producto.

II.1. "Wakame".

"Wakame" es el nombre japonés para la feofíceea Undaria pinnatifida (Harv.) Suringar, perteneciente al orden Laminariales. Es usada como alimento principalmente en Japón, Corea y China ³. Junto a los productos "Nori" y "Kombu", constituye la contribución más importante dentro de la alimentación oriental a base de algas marinas. La producción japonesa de U. pinnatifida alcanzó las 118.000 Tm (peso húmedo) en 1982 ⁷.

U. pinnatifida es una macroalga de 40-50 cm de longitud, y sólo crece en las costas de Japón y de Corea del Sur, en zonas de corrientes cálidas ⁷. Se recolecta entre febrero y junio mediante largos rastrillos usados a mano o por buceo ³. Su cultivo a gran escala ha contribuido a satisfacer la demanda para su uso como alimento. El cultivo de U. pinnatifida se inició en 1962, y progresivamente pasó a constituir la principal fuente de producción, hasta suponer el

90% de las cerca de 110.000 Tm (peso húmedo) producidas en Japón en 1979 ⁸.

El método de cultivo se inicia con la producción controlada de zoosporas. Las zoosporas producen pequeños esporófitos, adheridos a redes o cuerdas que luego son transportados al océano abierto para su crecimiento. El proceso dura 5 meses, y permite una producción de 5-10 Kg/m de cuerda ⁸. También se ha iniciado la mejora genética del alga, obteniéndose híbridos con una mayor productividad y una mejor respuesta a la temperatura del agua ³.

U. pinnatifida ha sido consumida en Oriente durante siglos como ingrediente de distintas clases de sopas, por ejemplo, sopa de pasta de haba de soja (misoshiru) y sopa de tallarines ⁷. El alga se procesa principalmente en dos tipos de productos, uno seco y otro hervido y salado. La forma más simple es el alga desecada y envasada. El "Narutowakame" es reconocido en Japón por su textura y color verde. Se obtiene mediante un procedimiento especial ("Haiboshi") en el que el alga es salpicada con cenizas de madera inmediatamente después de la recogida, y después es secada al sol en la playa. El "Wakame" hervido y salado se obtiene calentando el alga en agua durante 30-60 s a 80 °C. Tras eliminar el agua exprimiendo el alga, se añade la sal. Los productos de Undaria han sido recomendados por especialistas en investigación médica, farmacológica y nutricional para el tratamiento de enfermedades como hipertensión, arterioesclerosis y en algunas hepatopatías ⁹.

El producto "Wakame" analizado consistía en el alga desecada y envasada en una bolsa de plástico transparente. Se recomendaba en la etiqueta su uso en la elaboración de sopa.

II.2. "Hijiki".

"Hijiki" (Hijikia fusiforme Okam.) es una macroalga feofíceica del orden Fucales que crece en las costas meridionales japonesas sobre las rocas, cerca de la línea de aguas profundas ³. Se recoge de enero a mayo, siendo el mejor periodo los primeros meses del año, cuando las plantas son pequeñas y tiernas. Tras la recolección, se hierven y secan al sol repetidas veces, proceso que elimina su original sabor amargo, y que produce su característico color negro.

H. fusiforme se consume como alimento cotidiano en Japón, Corea y China. Se consume tras hervir con agua, salteada con verduras, en sopas o cocinada con haba de soja.

Al igual que "Wakame", el producto "Hijiki" analizado se presentaba como alga desecada y envasada en bolsa de plástico. La preparación también era similar, siendo recomendada la cocción en agua junto con cebolla y aceite para la elaboración de la sopa.

II.3. "Dulce".

"Dulce" es el nombre popular de la rodofíceica Palmaria palmata (L.) Kuntze (antes Rhodymenia palmata (L.) Grev.). Su consumo durante siglos como alimento en regiones costeras de Europa y más recientemente en Norteamérica constituye una excepción a la aportación minoritaria de las algas dentro de la alimentación occidental ¹⁰.

P. palmata se distribuye a lo largo de las aguas más frías del Atlántico Norte y del Pacífico Norte. Crece sobre las rocas cerca de las aguas profundas, y también se encuentra en abundancia fijadas al talo del alga Laminaria hyperborea ³. Se conoce por los habitantes locales como "Dulse" (Gran Bretaña y Norteamérica), "Dillisk" (Irlanda), "Söl"

(Islandia), "Søl" (Noruega), "Goemon à vache" (Francia) o "Darusu" (Japón) ¹⁰.

La época de recogida de P. palmata es de mediados de mayo a octubre ³. El alga se seca al sol y al viento durante unas 6 horas inmediatamente después de la recogida. Tras el secado las algas se vuelven negras, aunque bajo condiciones apropiadas retornan a su color rojizo característico. En algunas ocasiones se ha incrementado la producción mediante el almacenamiento de las algas en tanques con agua de mar tras la recogida.

P. palmata se consume en Islandia desde el siglo VIII. En los tiempos antiguos se comía junto con pescado desecado, mantequilla y patatas, y en épocas de hambre se utilizaba para hacer pan. En Canadá se consume como aperitivo, mientras que en la URSS se fermenta para producir una bebida alcohólica ³.

El producto "Dulce" seleccionado, al igual que los anteriores, se adquirió como algas desecadas en bolsas de plástico. Se podía consumir cruda, tras unos minutos suspendida en agua, o tras añadirsele aceite y limón o azúcar. También se podía consumir hervida con verduras, cereales o leche.

II.4. "Fucus".

El género Fucus pertenece al orden Fucales, dentro de la clase Feocíceas. Las especies de este género son frecuentes en muchos mares de Europa, y alcanzan más de un metro de largo ¹¹. Las especies más representativas son Fucus serratus L., Fucus spiralis L. y Fucus vesiculosus L. F. serratus se caracteriza por tener el borde del talo aserrado; F. spiralis posee vesículas flotadoras globosas en la zona terminal del talo; en F. vesiculosus las vesículas están repartidas por todo el talo.

Dentro de la característica zonación horizontal existente en las costas, las distintas especies de Fucus aparecen a distintos niveles. F. spiralis aparece en la zona litoral superior, F. vesiculosus en una zona un poco más inferior, y F. serratus cerca de la zona de aguas profundas ³. La distinta capacidad de las tres especies para resistir a la desecación está de acorde con su distribución espacial ¹².

De las macroalgas anteriormente citadas, quizás sea Fucus la que tiene un consumo más restringido como alimento humano. F. vesiculosus se consume en Escocia, Irlanda y otros países de Europa Occidental. Es además utilizada en Estados Unidos de América y Alaska para hacer té ³.

El producto analizado se presentaba como comprimidos de 0.6 g envasados en frascos de cristal transparente. La dosis recomendada por los fabricantes era de 1.8 a 5.4 g por día. Se indicaba en la etiqueta la presencia de almidón en el preparado.

II.5. "Chlorella".

El género Chlorella, dentro del orden Chlorococcales, comprende clorofíceas unicelulares de forma esférica o elipsoidal, con un ciclo de vida simple. Su reproducción es exclusivamente asexual, produciendo cada célula madura 4, 8 ó 16 autosporas ¹³. Las distintas especies de Chlorella tienen una distribución cosmopolita, habiéndose aislado de hábitats muy distintos, tanto acuáticos como terrestres.

La taxonomía de este género es más bien confusa, debido a la escasa diferenciación morfológica de las células y a la variabilidad de caracteres taxonómicos tales como tamaño y forma de células y cloroplastos, visibilidad del pirenoide, etc. Esto ha conducido, por ejemplo, a que la misma estirpe haya recibido distintos nombres en distintas colecciones de cultivos del mundo ¹⁴. El nombre Chlorella pyrenoidosa Chick,

utilizado por los fabricantes con el alga presente en el producto analizado, es una sinonimia de Chlorella vulgaris Beij. var. vulgaris.

Las compañías que se dedican a la producción industrial de Chlorella para consumo humano se localizan principalmente en el sudeste asiático, en particular Japón y Taiwan ¹⁴. En Taiwan la producción a gran escala comenzó en 1966, y en 1977 ya existían 30 factorías con una capacidad total de producción de 1000 Tm/año ¹⁵.

Chlorella se produce industrialmente tanto de forma autótrofa como heterótrofa. Los sistemas de cultivo utilizados son de cuatro tipos: estanque al exterior con agitación, estanque al exterior con circulación, fermentadores cerrados y una combinación de estanque al exterior y fermentador. La producción es notablemente favorecida por la adición de acetato o glucosa como fuente de carbono, además del CO₂ aportado durante el día. El producto final se distribuye como polvo o como pastillas para su consumo como producto dietético. También se produce el denominado "Factor de Crecimiento Chlorella", que favorece el crecimiento de las bacterias lácticas y la producción de ácido láctico ¹⁵.

El producto "Chlorella" analizado en el presente trabajo consistía en comprimidos de 0.6 g. El consumo recomendado por los fabricantes era de 3 a 6 g por día.

II.6. "Spirulina".

Spirulina es una cianobacteria (o "alga verde-azulada") filamentosa. Los filamentos, constituidos por células cilíndricas de 1 a 12 μm de diámetro, tienen una característica forma helicoidal, son móviles y carecen de heterocistos. Las especies de este género pueden encontrarse en hábitats muy diversos, como suelos, marismas, aguas

salobres y marinas, y fuentes termales ¹⁶. Spirulina está especialmente adaptada a vivir en aguas con un pH elevado.

Debido principalmente a su organización celular procariótica, se considera en la actualidad a las cianobacterias como bacterias fototróficas, en contraposición a su tradicional concepción como alga. Esta última es también mantenida por algunos investigadores, especialmente del campo de la Ecología. Por criterios de uniformidad, en el presente trabajo Spirulina es tratada como alga.

Dentro de la confusión existente en la taxonomía de las cianobacterias, la definición de las distintas especies de Spirulina, e incluso la del propio género, ha sufrido diversos cambios ¹⁷. La forma helicoidal de los filamentos de Spirulina es una propiedad estable y constante, lo que le permite diferenciarla de las otras cianobacterias filamentosas ¹⁸. Tamaño y forma de las células son los caracteres normalmente utilizados a nivel de especie ¹⁶. Las dos especies más comunmente consumidas como alimento son Spirulina platensis (Nordst.) Geitl. (Syn.: Spirulina jenniferi var. platensis Nordstedt) y Spirulina maxima (Setch. y Gardn.) Geitl. (Syn.: Spirulina geitleri De Toni; Arthrospira maxima Setchell y Gardner). Estas especies crecen abundantemente en ciertos lagos alcalinos de Africa y América Central.

Se conocen distintos ejemplos en la Historia del uso de Spirulina como alimento. Los habitantes del Valle de Méjico la consumían ya en tiempos de la conquista española, en forma de una pasta que ellos llamaban "tecuitlatl" ¹⁹. Spirulina también ha sido consumida por los habitantes de las orillas del lago Chad en Africa. El pastelillo o "dihé" formado a partir de Spirulina es consumido incluso en la actualidad en épocas de hambre ¹⁶.

Spirulina es también hoy producida industrialmente en varios países para el consumo humano. La producción mundial alcanzó las 720 Tm peso seco/año en 1984 ²⁰. Las principales

plantas de producción están localizadas en Tailandia, Méjico, Japón, Israel, USA y Taiwan, y dirigen su producción principalmente al mercado de productos dietéticos. En cada país, las condiciones locales determinan la elección de los materiales para la construcción del estanque de cultivo y para la nutrición del alga ¹⁶. La mayoría de los tanques de cultivo comerciales se basan en cursos poco profundos por los que pasa el cultivo gracias a un flujo turbulento creado por paletas rotatorias. La planta con mayor producción del mundo, Sosa Texcoco (Méjico), constituye una excepción. En ella se han adaptado un lago natural y la existencia de una planta de producción de bicarbonato sódico a la producción de Spirulina maxima, que crece naturalmente en las aguas alcalinas del lago ¹⁹.

Una vez producida, la biomasa de Spirulina se recoge generalmente por filtración, proceso que es facilitado por la longitud de sus filamentos. Después de eliminar los carbonatos absorbidos vertiendo la biomasa en agua ácida a pH 4, ésta se seca, proceso que puede constituir hasta un 30% del coste de producción ¹⁶. El método usual de secado utiliza una corriente de aire (atomización), que produce un producto de gran calidad a partir del cual se forman fácilmente los comprimidos.

Spirulina quizás sea el alga con la que se han realizado más estudios toxicológicos con animales. Estudios publicados por laboratorios independientes de todo el mundo confirman la ausencia de efectos tóxicos cuando Spirulina supone una significativa proporción de la proteína de la dieta en animales. Los estudios en humanos son mucho más escasos. Sólo en raras ocasiones se han observado problemas agudos de tipo gastrointestinal ²⁰.

Se seleccionaron tres diferentes productos a base de Spirulina para el presente estudio. Dos de ellos se presentaban como comprimidos (de 0.5 y 0.6 g, respectivamente), y el restante como cápsulas de 0.4 g, de las que fácilmente se podían extraer la biomasa en forma de polvo.

Sólo en uno de los dos productos en comprimidos se indicaba la especie, Spirulina platensis. El producto en cápsulas contenía Spirulina maxima. La dosis diaria recomendada para los distintos productos era 1.8-3.6 g (Spirulina sp.), 3-4.5 g (Spirulina platensis) y 0.4-3.2 g (Spirulina maxima).

III. COMPOSICION QUIMICA GENERAL DE LOS PRODUCTOS.

III.1. Introducción.

La composición química de un alimento proporciona una información básica sobre su potencial nutritivo. La determinación de las proporciones de los distintos principios inmediatos, así como de sustancias potencialmente tóxicas en la biomasa de las algas, es un requisito para determinar si éstas pueden satisfacer, como alimento, las necesidades humanas de energía y nutrientes, y si su consumo puede afectar negativamente la salud del que la consume.

Sin embargo, otras consideraciones, al menos de igual importancia desde el punto de vista de las ciencias de la nutrición, escapan al análisis químico de un alimento. Por un lado, es relevante el mismo comportamiento "in vivo" del alimento al ser ingerido. Por otro, hay una serie de factores culturales, económicos, sociales y psicológicos que son esenciales en la determinación de los hábitos alimentarios ²¹. Cómo estos factores pueden afectar al consumo en el futuro de productos alimenticios con algas en nuestra sociedad es un problema que se escapa de los objetivos de esta tesis. No obstante, el análisis químico de estos productos es una pieza esencial a la hora de considerar su calidad como alimento.

Los distintos componentes de la dieta proporcionan al hombre la energía y los nutrientes necesarios para el mantenimiento de sus actividades fisiológicas ²¹. Los hidratos de carbono constituyen esencialmente una fuente energética al ser oxidados en el cuerpo. Los polisacáridos celulósicos indigestibles constituyen además una materia fibrosa beneficiosa para la acción peristáltica del intestino. Los lípidos cumplen en la alimentación humana varias funciones, ya que además de su notable valor calórico, pueden servir de vehículo para los ácidos grasos esenciales y para las vitaminas, teniendo además un importante papel en la aceptabilidad de los alimentos. Las proteínas proporcionan los aminoácidos que pasan a formar parte del "pool" corporal, que se

utiliza en la síntesis de las proteínas propias. Pueden ser también utilizadas como fuente de energía, en caso de que los hidratos de carbono y los lípidos no sean suficientes para cubrir las demandas energéticas del cuerpo. Por último, los minerales son necesarios para el mantenimiento de importantes funciones en el organismo.

Al margen de los aspectos nutricionales de los distintos componentes de la biomasa algal, que serán tratados en su mayor parte en las secciones posteriores del presente trabajo, el contenido en humedad, de clorofila *a* y de ácidos nucleicos tienen, por otra parte, importancia en cuanto a la higiene y toxicología de estos productos alimenticios.

III.2. Resultados.

El contenido en componentes principales de los productos aparece en la Tabla 1. La representación gráfica para los productos "Wakame" y "Spirulina" (*S. maxima*) aparece en las Figuras 1a y 1b, como productos representativos de macro y microalgas, respectivamente.

III.2.1. "Wakame".

Este producto contuvo la mayor proporción de humedad de los productos estudiados. El contenido en minerales fué también alto, típico de una macroalga marina. Los resultados obtenidos son muy similares a los publicados para la composición química de *Undaria pinnatifida* ^{7,22}. La baja proporción de ácidos nucleicos es típica de una macroalga marina.

III.2.2. "Hijiki".

La composición química general de este producto fué similar a la de "Wakame". Los resultados obtenidos también

Tabla 1. Composición química general de los productos estudiados (g/100 g peso seco).

Muestra	Humedad ^a	Proteína	Hidr.carbono	Lípidos	Ac.nucleicos	Clorofila
<u>U. pinnafitida</u>	10.9	12.5	39.2	1.9	1.2	0.09
<u>H. fusiforme</u>	10.2	10.0	52.7	0.7	1.2	0.07
<u>R. palmata</u>	6.9	10.1	65.1	0.9	1.3	ND
<u>Fucus sp.</u>	9.3	7.3	56.0	1.4	1.6	0.04
<u>C. pyrenoidosa</u>	6.5	56.0	17.9	8.6	5.4	1.11
<u>Spirulina sp.</u>	7.4	60.9	18.8	6.5	4.8	0.93
<u>S. platensis</u>	6.9	56.6	16.0	7.5	4.8	0.86
<u>S. maxima</u>	7.2	68.9	12.6	6.4	5.7	0.90

^a g/100 g producto

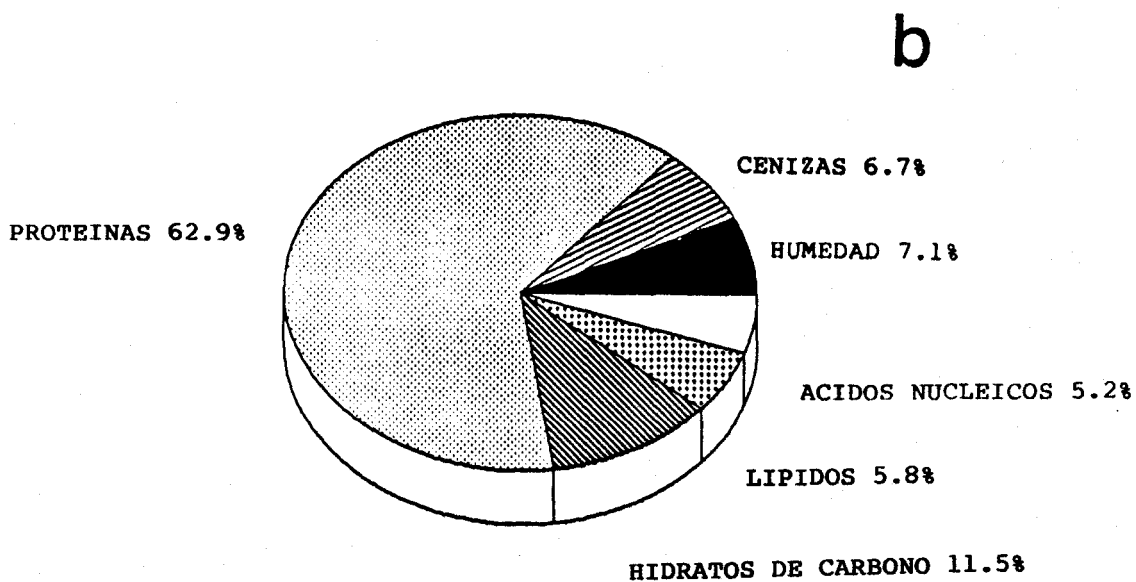
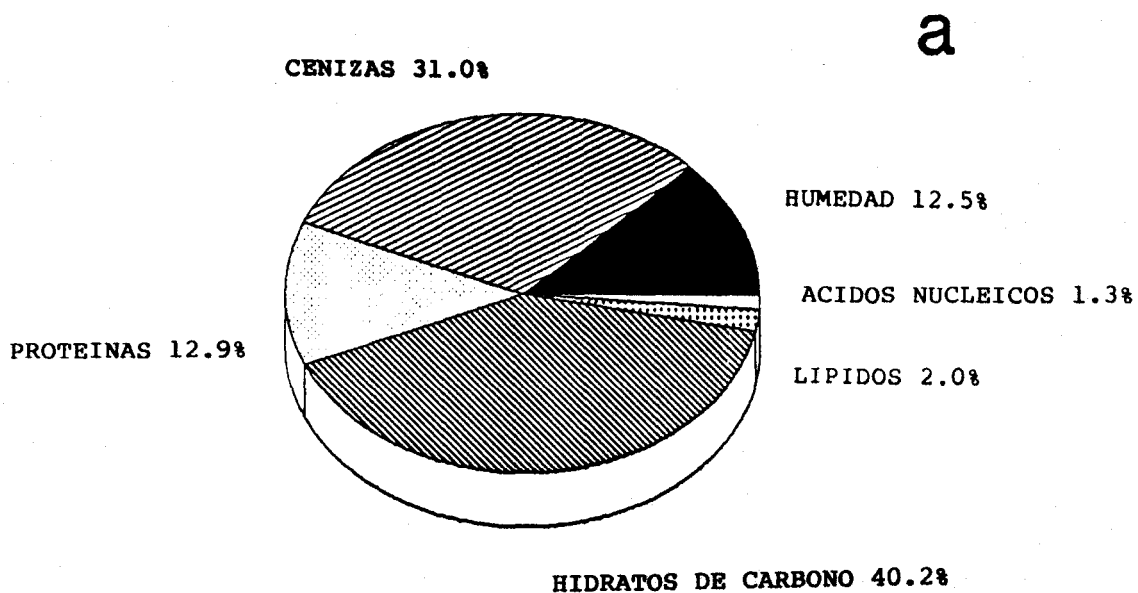


Figura 1. Composición química general de los productos "Wakame" (U. pinnatifida) -Fig. 1a- y "Spirulina" (S. maxima) -Fig. 1b-.

están en concordancia con resultados previos para Hijikia fusiforme ⁷. El contenido en cenizas del producto es algo superior al publicado (18.3%).

III.2.3. "Dulce".

El producto con Palmaria palmata presentó un alto contenido en hidratos de carbono, típico para los valores publicados para esta especie, y un bajo contenido en cenizas. P. palmata suele contener 12-37% de cenizas, 8-35% de proteína cruda, 38-74% de hidratos de carbono y 0.2-3.8% de lípidos ¹⁰. Aparentemente, no existen resultados previos sobre el contenido en ácidos nucleicos en esta especie.

III.2.4. "Fucus".

El mayor contenido en cenizas de los productos estudiados se dió en este producto. La proporción en hidratos de carbono se calculó según la fórmula de Spoehr y Milner ²³(ver Material y Método, Apartado VIII.3.3.), dado que posiblemente la presencia de manitol, frecuente en este género ²⁴, interfería en el ensayo del fenol-ácido sulfúrico. El valor obtenido según la fórmula (56%) fué bastante parecido al calculado por diferencia hasta el 100% de los otros componentes (58.8%).

Este producto mostró una composición parecida a la descrita para las distintas especies de Fucus ^{24,25}. El contenido en cenizas es ligeramente superior (18.3-30.5%). La presencia de almidón en el preparado, que según los resultados de la sección V, no constituía más del 5% del mismo, no pareció alterar excesivamente las proporciones de los distintos componentes del alga.

III.2.4. "Chlorella".

Este producto presentó una composición química típica de microalgas, con mayor contenido proteico que las macroalgas. Además, fué el que presentó más contenido en lípidos y clorofila de los productos estudiados. Los resultados obtenidos se asemejan a los publicados para Chlorella vulgaris y C. pyrenoidosa ²⁶. Existe una notable influencia de las condiciones de cultivo utilizadas sobre la composición química de las microalgas. Esto puede explicar, por ejemplo, el alto contenido en lípidos del producto con respecto al valor publicado para C. pyrenoidosa (8.6% frente a 2%), y el bajo contenido en hidratos de carbono (17.9% frente a 26%). El contenido en clorofila fué inferior al que presentan normalmente los productos con Chlorella (ver Discusión). Estas diferencias pueden deberse al cultivo heterotrófico posiblemente utilizado en la producción de esta biomasa, tal como se refleja en la composición de ácidos grasos (ver Sección VI).

III.2.5. "Spirulina".

Los tres productos con Spirulina presentaron composiciones químicas muy parecidas entre sí y con respecto al producto "Chlorella". Los resultados obtenidos también se corresponden con los valores publicados previamente para las distintas especies de este género ²⁶. El producto con S. maxima presentó un contenido en ácidos nucleicos superior a los valores publicados para Spirulina.

III.3. Discusión.

III.3.1. Diferencias en la composición de macroalgas y microalgas.

La composición general de los productos estudiados es un reflejo de las profundas diferencias biológicas entre las especies de algas que los constituyen. Básicamente, se pudieron observar marcadas diferencias entre los productos elaborados con macroalgas de los elaborados con microalgas. Los productos con macroalgas se caracterizaron por una mayor proporción de cenizas y carbohidratos. En cambio, el contenido en proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y clorofila a fué superior en los productos con microalgas. Estas diferencias entre ambos tipos de productos se pudieron observar al profundizar en la composición de la mayoría de estas fracciones, tal y como se ve reflejado en las demás secciones del presente trabajo. Este hecho no es sorprendente, dadas las diferencias de tipo ecológico, morfológico y fisiológico entre ambos grupos de organismos. Además, las técnicas empleadas en la producción de su biomasa son conceptualmente distintas (ver Sección II).

III.3.2. Porcentaje de humedad.

El contenido en humedad de los productos puede influir en la susceptibilidad del crecimiento de microorganismos contaminantes. Los microorganismos pueden mantener sus actividades metabólicas normales sólo en cierto intervalo de actividad hídrica. En la biomasa algal seca, como en la mayor parte de los alimentos, existen tres regiones en la curva de humedad respecto a actividad hídrica ²⁷. Por debajo de 2% de humedad, el agua está en forma de capa monomolecular, no disponible para las funciones biológicas. Por encima del 12%, las algas contienen agua libre que puede sostener el crecimiento bacteriano y fúngico. Se observa que ninguno de

los productos estudiados en este trabajo sobrepasó este límite, siendo en este aspecto totalmente aptos para el consumo.

III.3.3. Contenido en clorofila a.

El contenido en clorofila a de los productos con algas ha causado en ocasiones problemas de tipo toxicológico ^{26,27}. Los productos de degradación de la clorofila, tales como el feofórbido a, han causado irritaciones en la piel en humanos después del consumo de Chlorella. Estos pacientes contrajeron dermatitis fotosensible, una inflamación agravada por la exposición a la luz. La formación de feofórbido en la biomasa del alga depende de la acidez, que produce la pérdida del átomo de magnesio, y de la actividad clorofilasa, que cataliza la pérdida del residuo de fitol en la molécula de clorofila. Una vez absorbido el feofórbido por el organismo humano, pasa a la sangre y circula a todo el cuerpo. Al alcanzar la piel o los órganos cercanos de la superficie corporal, la exposición del feofórbido a la luz induce la formación de oxígeno, oxidándose a su vez los ácidos grasos de las membranas celulares. Esto da lugar a la rotura de membranas y al incremento de la permeabilidad de la pared capilar ²⁷.

El contenido en clorofila a de los productos estudiados fué bajo, incluso para el producto "Chlorella" (1.11%), que suele contener de 2 a 3% ²⁷. Por tanto, la presencia de feofórbido en estos productos puede ser menos problemática.

III.3.4. Proporción de ácidos nucleicos.

El contenido en ácidos nucleicos tiene también implicaciones toxicológicas. Los ácidos nucleicos producen ácido úrico al ser digeridos, que pueden precipitar y formar depósitos de cristales de urato sódico en el cartílago. Este proceso puede resultar por ejemplo en la aparición de gota o

en la formación de cálculos en el riñón ²⁰. Sin embargo, tomando un valor máximo premisible de ingesta diaria de 2 g de ácidos nucleicos ²⁸, estos productos no representan este riesgo con una toma diaria de hasta 30 g en el caso de los niveles más altos, cantidades muy por encima de las recomendaciones de los fabricantes, siempre, claro está, que no se consideren otras fuentes de ácidos nucleicos en la dieta.

IV. COMPOSICION MINERAL.

IV.1. Introducción.

IV.1.1. Distribución de los elementos en las algas.

Las algas toman del medio que les rodea los distintos minerales requeridos para su crecimiento. A medida que avanzan los conocimientos en la biología molecular de estos organismos se encuentran nuevos requerimientos minerales dentro de sus procesos celulares. En la Tabla 2 aparece la composición mineral media en las algas, junto a las funciones biológicas conocidas de cada elemento. Esos valores son sólo indicativos, ya que existe una gran variación entre distintas especies e incluso dentro de una misma especie al variar las condiciones en las que ha crecido. La mayor parte de la variación en C, H y O se da entre especies. Con otros elementos, las variaciones entre distintas especies pueden ser en determinados casos comparables a las que se dan dentro de una misma especie ²⁹.

Los nutrientes minerales necesarios para el crecimiento de las algas se suelen dividir arbitrariamente en macronutrientes y micronutrientes. Se consideran macronutrientes los elementos necesarios en el medio a una concentración igual o superior a 1000 ppm (0.1%) ¹⁴. Aunque los requerimientos pueden variar de unas especies a otras de algas ³⁰, se suelen incluir dentro de los macronutrientes los elementos N, P, K, Ca, Mg, Na, S y Cl. Los elementos Ni, Co, Cu, Fe, Mn y Zn se consideran micronutrientes.

Al margen de estos requerimientos fisiológicos, la composición mineral de las algas depende notablemente de la concentración de los distintos elementos en el medio. Por ejemplo, el contenido en Na, K, Ca y Mg tiende a ser mayor en las algas marinas ²⁹. En ellas, además, el factor de concentración y para cada elemento (definido como la razón entre las concentraciones del mismo en el alga y en el agua) guarda una relación de tipo exponencial con el tiempo de residencia x en el océano del elemento en cuestión, que indica

Tabla 2. Composición mineral de las algas (incluye sólo los elementos requeridos para el crecimiento y con función biológica conocida, y se excluyen Cl, Ni, I y V por falta de información). Tomado de Healey ²⁹, Oh-Hama y Miyachi ¹⁴ y Rai et al. ³¹.

Elemento	Media (g/100 g)	Intervalo	Funciones
H	6.5	2.9 - 10.0	Constituyente de componentes estructurales principales de la célula
C	43.0	17.5 - 65.0	"
O	27.5	20.5 - 33.0	"
N	5.5	1.0 - 14.0	"
P	1.1	0.1 - 3.3	" y metabolismo energético
K	1.7	1.0 - 7.5	Cofactor enzimático; implicación en diversos procesos celulares (estructura de ribosomas, síntesis de proteínas y almidón, regulación osmótica)
Ca	0.87	0.0 - 8.0	Constituyente de la pared celular
Mg	0.56	0.1 - 7.5	Constituyente de la clorofila, ribosomas y cromosomas; reacciones de enlace fosfato (ATP)
Na	0.61	0.04- 4.7	Regulación osmótica; activador enzimático
S	0.59	0.2 - 1.6	Constituyente de algunas proteínas
Si	5.40	0.0 - 23.0	Constituyente de componentes estructurales principales de la célula (pared celular en diatomeas)
		(mg/Kg)	
Fe	5900	200 - 34000	Constituyente de citocromos, ferredoxina y proteínas de las cadenas transportadoras de electrones; diversas reacciones enzimáticas
Zn	280	5 - 1000	Cofactor de varios enzimas; estabilidad de ribosomas
B	30	1 - 250	Metabolismo del Si en diatomeas
Cu	100	6 - 300	Constituyente de la plastocianina y de varios enzimas
Mn	60	20 - 240	Asociación con el centro de producción de O ₂ de la cadena fotosintética de transporte electrónico; constituyente de la superóxido dismutasa
Co	60	0.1- 200	Fijación de nitrógeno; funciones asociadas a la vit. B ₁₂
Mo	0.8	0.2- 1	Constituyente de la nitrato reductasa y nitrogenasa

la reactividad geoquímica que exhiben los elementos en el agua marina ^{32,33}:

$$(1) \quad y = ax^b$$

$$(2) \quad \log y = \log a + b \log x$$

El valor b es negativo, por lo que al aumentar el tiempo de residencia, disminuye el factor de concentración. Esta relación sugiere una conexión entre la toma de un determinado elemento por las algas y la reactividad geoquímica del mismo en el agua marina ³². La capacidad de ciertos vegetales para concentrar determinados elementos, por ejemplo Ni, Co, Zn, Mn, etc., puede utilizarse en quimiosistemática como carácter taxonómico ³⁴. A pesar de las dificultades asociadas a la generalización de los valores de tiempo de residencia oceánica y concentración en el agua marina de los elementos, se ha sugerido la utilización de los valores numéricos que gobiernan en cada especie esa relación exponencial para caracterizar la distribución de los elementos en las distintas especies ³². En la Tabla 3 figuran valores generales de tiempo de residencia oceánica y concentración en el agua tomados de la literatura ^{32,35}.

Aparecen además en la composición mineral de las algas proporciones variables de una serie de elementos (Pb, Cd, Hg, Ag) que probablemente carecen de una función biológica concreta. En general, la composición mineral de las algas suele reflejar la del medio donde han crecido.

IV.1.2. Toma de metales pesados por las algas.

Parte de los elementos que constituyen la materia mineral de las algas son metales pesados (usualmente definidos como los elementos con una densidad superior a 5 g cm^{-3}): Ni, Co, Cu, Mn, Zn, Pb, Cd, Cr, Hg y Ag. Estos elementos son tóxicos

Tabla 3. Valores generales de tiempo de residencia oceánica y concentración en el agua marina de los distintos elementos ³².

Elemento	Tiempo de residencia (año)	Concentración (mg/l)
Al	100	0.001
Fe	200	0.003
Mn	10000	0.002
Ga	10000	0.00003
Ti	13000	0.001
Si	18000	3
Cu	20000	0.003
Zn	20000	0.01
Cr	20000	0.0005
V	80000	0.002
Ni	90000	0.007
Co	160000	0.0004
P	180000	0.09
Mo	700000	0.01
Ca	1000000	410
Sr	4000000	8
K	7000000	390
Mg	12000000	1300
B	18000000	4.5
Na	68000000	11000

en ciertas concentraciones para las algas y los organismos en general. El reservorio final de estos y otros xenobióticos en la naturaleza es el ambiente acuático ³⁶. A diferencia de otras sustancias potencialmente tóxicas como herbicidas y pesticidas, que, aunque lentamente, pueden ser degradadas, los metales pesados no pueden ser eliminados de los ecosistemas acuáticos y persisten en los sedimentos, desde donde se liberan lentamente al agua ³¹. El equilibrio entre los procesos naturales de erosión geológica y liberación de metales pesados frente al de acumulación de los mismos en los sedimentos es perturbado por las actividades humanas, lo que origina un aumento en la concentración de metales pesados en el ambiente ³¹. Este aumento llega en determinados casos a producir graves problemas de contaminación, incluso afectando la supervivencia de los organismos presentes en el ecosistema. Entre los elementos más nocivos se encuentran Cu, Cr, Cd, Zn, Pb y Hg ³⁷. Además, los metales pesados pueden acumularse y transformarse en complejos orgánicos más tóxicos dentro de las redes tróficas hasta alcanzar niveles peligrosos en los peces que se consumen como alimento humano. Por ejemplo, entre 1953 y 1972 en Minamata (Japón) se detectaron 704 intoxicados por comer pescados contaminados con metil-mercurio, capturados en aguas costeras cercanas a la instalación de una fábrica de plástico, muriendo 82 de ellos por esa causa ³⁸.

Los mecanismos por los que las algas toman los metales pesados del medio son pasivos y activos ³¹. Estudios con radioisótopos revelan que la toma de metales pesados por las algas ocurre frecuentemente en dos fases: (1) una acumulación pasiva inicial consistente en la simple adsorción del metal sobre la superficie exterior de las células, que no requiere de ningún proceso metabólico o energía, y (2) una toma más lenta, a través de mecanismos activos dependientes de procesos metabólicos que implican la entrada del metal en la célula, y que son los responsables de la toma de la mayor parte de los metales pesados presentes en las algas ^{31,39}. La toma de metales pesados por las algas es afectada por procesos metabólicos de la especie considerada, e influida por

parámetros físicos y químicos del ambiente. Así, además de la concentración del metal en el medio, en la toma de un metal determinado intervienen distintos factores como temperatura, pH, edad de las células algales, y presencia de otros metales. La influencia de localidades y estaciones diferentes puede ser significativa. En el caso de las macroalgas, la capacidad de acumular algunos elementos puede variar con la edad del fronde dentro del mismo alga, siendo las zonas más viejas las que más acumulan ³¹. Dada la capacidad de muchas especies de algas de acumular metales pesados a una concentración mucho mayor que la del medio que les rodea, éstas se han utilizado como monitores de la contaminación por metales pesados en ecosistemas acuáticos ^{39,40}, o para la eliminación de los metales pesados en la depuración de las aguas ⁴. También se ha propuesto que los polisacáridos de las macroalgas pueden ser utilizados para prevenir el envenenamiento por metales pesados, gracias a su capacidad de adsorción ⁴¹. Asimismo, se ha propuesto que la capacidad de las macroalgas marinas de acumular metales puede utilizarse para el desarrollo de métodos de obtención de microelementos del mar ⁴².

En el caso de cultivo a gran escala de microalgas, la contaminación por metales pesados puede también originarse por el mismo proceso de producción, que conlleva la existencia de fuentes potencialmente contaminantes. Estas son: nutrientes añadidos al medio, incluyendo las sustancias utilizadas para alcanzar determinados niveles de alcalinidad y salinidad; materiales utilizados para la construcción de los estanques de cultivo, como los plásticos a base de cloruro de polivinilo estabilizados con plomo; y sustancias inhibidoras de las bacterias del suelo, utilizadas para evitar el biodeterioro de los mismos plásticos ²⁷.

IV.1.3. Requerimientos y niveles de toxicidad en el hombre.

A la hora de utilizar las algas como alimento, su composición mineral tiene por tanto relevancia nutricional y toxicológica: por una parte, en cuanto al contenido de cantidades beneficiosas de minerales necesarios en la dieta humana; por otra, en cuanto a la posible presencia de niveles tóxicos de metales pesados. En la Tabla 4 se recogen las tomas de minerales recomendadas para el hombre (tomando como standard una persona adulta de 70 Kg) por diversas organizaciones internacionales, y asimismo los límites que son considerados peligrosos para determinados elementos. Los elementos minerales requeridos en la dieta del hombre tienen dos tipos de funciones, estructurales y regulatorias. Las estructurales afectan al esqueleto y a los tejidos blandos; Las regulatorias comprenden una amplia gama de procesos fisiológicos tales como coagulación de la sangre, transmisión neuromuscular, transporte del oxígeno, y regulación enzimática ⁴³. Los distintos elementos necesitados en la dieta humana se suelen clasificar en electrolitos, minerales y elementos traza. Se ha demostrado la esencialidad en humanos para nueve de los elementos traza que aparecen en la Tabla 4. El resto (Mn, As, Sn, V, Ni y Si) también son necesarios, dada su participación en reacciones vitales o su esencialidad en animales. Debido a su extendida presencia en los alimentos, y dada las pequeñas cantidades necesarias, sólo en raras ocasiones se encuentran casos de deficiencias en elementos traza ⁴⁴.

No es posible hacer una distinción clara entre elementos metálicos tóxicos y esenciales, dado que todos los metales son tóxicos si son ingeridos en cantidades suficientes. Algunos de los elementos requeridos en la dieta en pequeñas cantidades producen efectos tóxicos cuando se alcanzan unos límites no muy lejanos a las tomas recomendadas. Los elementos Hg, Pb y Cd se consideran eminentemente tóxicos, dada su falta de

Tabla 4. Requerimientos minerales en la dieta humana y valores desaconsejados de ingesta 27,43,44.

Elemento	Toma diaria recomendada	Toma diaria desaconsejada	Prod. pesca ^a	Chlor. ^b	Spir. ^c	SCP ^d
Minerales						
Ca	1 g	< 400 mg > ?				
P	1 g	< 400 mg > ?				
Mg	400 mg	< 250 mg > 5000 mg				
Electrolitos						
Na	2-7 g	< 70 mg > 16 g				
K	2-6 g	< 100 mg > 18 g				
Cl	3-12 g	< 100 mg > 25 g				
Elem. traza						
Fe	10-18 mg	< 10 mg > 25-75 mg				
F	1.5-4 mg	< ? > 20-80 mg				
Zn	15 mg	< 5 mg > 30 mg				
Cu	2-3 mg	< 1 mg > 10-35 mg	20 ppm			
Si	?	< ? > ?				
As	?	< ? > 3.5 mg	1 ppm	2 ppm	2 ppm	2 ppm
Se	0.05-0.2 mg	< 0.05 mg > 0.2 mg				
Mn	2.5-5 mg	< 2.5 mg > 5 mg				
Sn	?	< ? > 140 mg	250 ppm			
I	0.15 mg	< 0.15 mg > ?				
Ni	?	< ? > ?				
Mo	0.15-0.5 mg	< ? > 0.5 mg				
Cr	0.05-0.2 mg	< ? > ?				
Co	?	< ? > 6-8 mg				
V	?	< ? > ?				
Elem. tóxicos						
Hg	0	- > 50 µg	1 ppm	0.1 ppm		0.1 ppm
Pb	0	- > 500 µg	3 ppm	2 ppm	20 ppm	5 ppm
Cd	0	- > 66-83 µg	1 ppm	0.1 ppm		1 ppm

^a Límites máximos permitidos en España para los productos de pesca ⁴⁵.

^b, ^c y ^d Límites máximos aconsejados para los productos de Chlorella, Spirulina y proteína de microorganismos respectivamente ²⁷.

esencialidad y sus efectos tóxicos a muy bajas concentraciones. La acción toxicológica de los distintos metales es muy diversa, dada su distinta naturaleza elemental y su afinidad por los distintos ligandos orgánicos del cuerpo ⁴⁶. Su ingestión continuada, aún a bajas concentraciones, origina una acumulación del metal en el organismo pudiendo llegar a producir manifestaciones tóxicas importantes. Los metales que probablemente ofrecen mayor riesgo de intoxicación alimentaria son Hg, Be, Pb, Cd, As y Cr ⁴⁷. Sanz y Nogué han descrito los distintos casos de intoxicaciones alimentarias por metales pesados ⁴⁸. El metal más frecuentemente implicado en este tipo de intoxicaciones es Pb. Así, por ejemplo, el saturnismo pueden producirse por consumo de aguas o vinos contaminados o por contaminaciones de los alimentos debido a los recipientes. Una vez absorbido, el Pb puede acumularse en órganos como hígado, bazo, riñones y de modo especial en los huesos, donde tiene una estrecha relación con el metabolismo del calcio ⁴⁹. El Cd también ha causado intoxicaciones alimentarias graves, como por ejemplo el síndrome de itai-itai, causado por la ingesta de arroz y soja contaminados por el agua de regadío cercana a un yacimiento minero en Japón. El Cu, contenido en cantidades elevadas en algunos cereales, frutos y pescados, también ha causado intoxicaciones alimentarias, al igual que Hg, Co, As y Se.

IV.1.4. Legislación de niveles de metales pesados en alimentos.

La intoxicación por metales de origen alimentario ha estimulado el establecimiento en los distintos países de límites máximos de determinados metales pesados en los alimentos. Tanto en España como en otros países estos límites no se han establecido de manera general, sino sólo para determinados tipos de alimentos. Para los alimentos que no son contemplados específicamente se siguen las directrices generales de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) (Tabla 4).

En el caso de la legislación española, está regulado el contenido de diversos metales pesados en productos tales como bebidas de varios tipos (cerveza, zumos de uva, aguas naturales, etc.), aditivos y colorantes alimentarios, sal de mesa, aceites vegetales y productos de pesca. Quizás debido a su carácter minoritario, las algas comestibles no se encuentran reguladas en este sentido. Probablemente sean los productos de pesca el tipo de producto que más pueda parecerse dentro de la legislación española a los productos estudiados en este trabajo, al menos a los de procedencia marina, aunque la aplicación de estos límites en este caso deba tomarse sólo de manera orientativa (Tabla 4).

En el resto de los países tampoco se contempla en este sentido a las algas dentro de la legislación alimentaria. Sin embargo, la relativa popularidad de las microalgas en Japón ha provocado el establecimiento por parte de los mismos fabricantes y comerciantes japoneses de unas recomendaciones para el contenido en determinados metales en Chlorella y Spirulina (Tabla 4). También existen unos límites recomendados por las Naciones Unidas, a través del PAG (Protein-Calorie Advisory Group), para la proteína de microorganismos (SCP) ²⁷, producto también parecido a los productos de microalgas estudiados en el presente trabajo.

IV.1.5. Técnicas analíticas.

Las técnicas analíticas utilizadas para el estudio de los niveles de elementos traza (o metales pesados) en materiales vegetales son muy diversas. La mayoría de los métodos de análisis incluyen un paso previo de eliminación de la materia orgánica antes de utilizar las distintas técnicas analíticas ⁵⁰. Esta mineralización se consigue mediante una oxidación húmeda, utilizando determinados ácidos como nítrico, perclórico o sulfúrico, o mediante incineración seca, a altas temperaturas en horno mufla. Cada método tiene diversas

ventajas e inconvenientes ⁵⁰. Por ejemplo, la oxidación húmeda es aplicable a una amplia variedad de muestras, es rápido y poco expuesto a pérdidas por volatilización. En cambio, no permite el uso de grandes cantidades de muestra, requiere supervisión constante y puede producir altos valores de blanco debido al uso de volúmenes de reactivos relativamente grandes. La mineralización seca permite el análisis de mayores cantidades de muestra, aunque es un proceso largo y se pueden dar pérdidas por volatilización.

Una vez mineralizada la muestra, las técnicas analíticas más usuales empleadas en el análisis de los distintos elementos son activación neutrónica, fluorescencia de rayos X y absorción atómica. La más utilizada es la espectrofotometría de absorción atómica con llama, que permite el análisis rutinario. Esta técnica se basa en la absorción de radiación emitida por una lámpara del elemento en cuestión por los átomos del mismo elemento presentes en la muestra al ser atomizada en la llama. La llama funciona así a modo de celda de un espectrofotómetro común ⁵¹. Las técnicas de absorción atómica, aunque muy fiables, por su mismo diseño no permiten el análisis simultáneo de distintos elementos. En cambio, las técnicas de emisión atómica sí lo permiten. Estas técnicas se basan en la medida de la radiación emitida por los átomos de la muestra al ser excitados ⁵¹. La radiación emitida por la muestra se selecciona a través de un monocromador, escogiendo la longitud de onda correspondiente a cada elemento. El análisis multielemental supone una ventaja cuando han de medirse muchos elementos. De las distintas formas de excitación de la muestra en esta técnica, en los últimos años ha tenido gran desarrollo las que utilizan un plasma de Argón. Un plasma es una mezcla gaseosa en la que una fracción de los átomos se encuentra en forma de iones ⁵¹. El plasma permite mantener de forma continuada las condiciones de excitación de la muestra, lo cual mejora los análisis en comparación a otras formas de excitación. La técnica de espectrofotometría de emisión con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES, del inglés "inductively coupled plasma-atomic emission

spectrometry") es quizás la técnica más conseguida de las que utilizan la fuente de plasma para el análisis espectroscópico de emisión ⁵¹.

IV.2. Resultados.

La composición elemental de los productos analizados aparece en la Tabla 5. Los resultados obtenidos para estos productos son similares a los obtenidos para otras algas ²³, siendo el valor de R (véase Material y Métodos, Apartado VIII.4.2.) inferior en los productos con macroalgas que en los de microalgas.

Los resultados del análisis de la materia mineral de tres lotes de cada producto aparecen en las Tablas 6 a 9. Se observa cierta variabilidad entre lotes para determinados productos y para distintos elementos, especialmente los minoritarios. Esto era esperable dada la variabilidad de las mismas algas y la de los ecosistemas de los que proceden.

En las Figuras 2 a 5 aparece la representación gráfica para cada producto con macroalgas de los valores de $\log y$ frente a los de $\log x$ (siendo y el factor de concentración y x el tiempo de residencia oceánica - véase Material y Métodos, apartado VIII.4.5.). En todos los casos hubo una relación lineal entre $\log y$ y $\log x$ estadísticamente significativa (t de student; $p < 0.005$). Los productos con macroalgas analizados en el presente trabajo, con la excepción de "Fucus", presentaron un coeficiente de correlación r con un valor absoluto inferior a 0.9 (entre 0.79 y 0.88). La variabilidad entre lotes de un mismo producto, especialmente en los elementos minoritarios, no produjo excesivas diferencias en cuanto a los parámetros $\log a$, b y r de cada lote. Cada producto presentó una distribución característica de los elementos diferente a la de los demás.

Tabla 5. Composición elemental y contenido en cenizas de los productos estudiados en el presente trabajo (en g/ 100 g peso seco libre de cenizas).

Muestra	C	H	O	N	S	Cenizas ^a	R
<u>U. pinnafitida</u>	49.79	7.66	37.60	3.06	1.89	30.2	39.06
<u>H. fusiforme</u>	46.99	6.47	41.86	2.67	2.01	25.7	33.76
<u>R. palmata</u>	45.19	7.12	45.58	1.81	0.30	16.2	32.92
<u>Fucus sp.</u>	44.67	6.23	45.05	1.57	2.48	30.9	30.93
<u>C. pyrenoidosa</u>	54.95	8.07	25.83	10.65	0.50	7.3	46.28
<u>Spirulina sp.</u>	51.71	7.48	29.19	10.99	0.63	9.7	42.10
<u>S. platensis</u>	53.29	7.92	27.45	10.66	0.68	14.0	44.46
<u>S. maxima</u>	53.45	7.62	25.51	12.45	0.97	7.3	44.46

^a En g/100 g peso seco.

Tabla 6. Contenido en macroelementos de los tres lotes analizados de cada producto elaborado a partir de macroalgas (g/ 100 g peso seco).

Muestra	Lote	P	K	Ca	Mg	Na
<u>U. pinnatifida</u>	A	0.465	5.104	1.232	0.854	7.935
	B	0.422	5.409	1.214	0.577	7.526
	C	0.422	5.880	1.063	0.597	5.634
<u>H. fusiforme</u>	A	0.142	12.426	1.410	0.533	3.324
	B	0.127	13.365	1.360	0.490	3.436
	C	0.141	9.879	1.328	0.559	2.860
<u>R. palmata</u>	A	0.223	10.206	0.340	0.158	0.810
	B	0.174	8.229	0.239	0.159	0.927
	C	0.160	9.630	0.267	0.150	0.802
<u>Fucus sp.</u>	A	0.150	3.689	2.600	0.549	4.286
	B	0.136	3.827	3.078	0.474	3.435
	C	0.129	4.239	1.584	0.612	4.415

Tabla 7. Contenido en microelementos de los tres lotes analizados de cada producto elaborado a partir de macroalgas (mg/Kg peso seco).

Muestra	Lote	Ni	Co	Cu	Fe	Mn	Zn	Pb	Cd	Cr
<u>U. pinnatifida</u>	A	3.6	1.2	7.7	95.3	9.9	16.5	4.5	0.6	3.6
	B	8.1	1.8	5.9	149.5	11.8	15.2	5.9	1.8	7.3
	C	5.3	2.2	4.9	48.5	6.3	69.1	4.8	1.0	3.2
<u>H. fusiforme</u>	A	5.4	2.3	6.5	60.3	8.0	9.1	13.8	2.3	3.5
	B	5.5	2.3	7.3	68.9	7.7	8.4	5.9	2.4	2.5
	C	7.6	2.9	5.2	472.9	30.2	13.7	5.1	0.8	6.0
<u>R. palmata</u>	A	6.1	1.7	7.6	55.1	9.4	32.8	4.9	0.3	2.0
	B	4.7	1.2	6.2	182.0	44.7	14.2	2.2	0.0	1.5
	C	4.3	1.4	5.3	192.6	47.4	12.8	4.4	0.4	1.6
<u>Fucus sp.</u>	A	11.8	4.5	16.9	2340.8	85.4	45.8	14.0	1.1	6.5
	B	9.1	5.2	17.8	4099.2	103.8	44.6	11.8	1.0	8.8
	C	9.7	3.1	9.7	1518.4	101.6	43.6	11.3	1.1	4.3

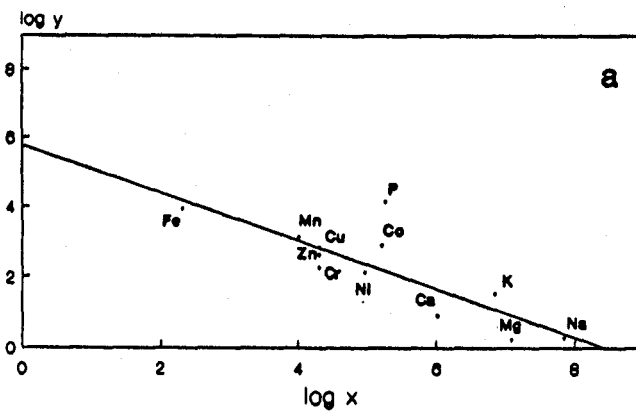
Tabla 8. Contenido en macroelementos de los tres lotes analizados de cada producto elaborado a partir de microalgas (g/100 g peso seco).

Muestra	Lote	P	K	Ca	Mg	Na
<u>C. pyrenoidosa</u>	A	1.883	0.919	0.484	0.451	0.034
	B	1.798	1.070	0.485	0.455	0.029
	C	1.455	0.856	0.303	0.352	0.080
<u>Spirulina sp.</u>	A	1.141	1.897	0.960	0.342	1.363
	B	1.122	1.936	0.953	0.356	1.742
	C	1.235	1.868	1.501	0.363	1.242
<u>S. platensis</u>	A	1.023	1.649	1.541	0.503	1.768
	B	0.965	1.786	2.246	0.410	1.400
	C	0.967	1.901	2.108	0.411	1.445
<u>S. maxima</u>	A	1.328	1.134	0.687	0.461	0.123
	B	1.397	1.267	0.838	0.453	0.121
	C	1.354	1.220	0.672	0.454	0.202

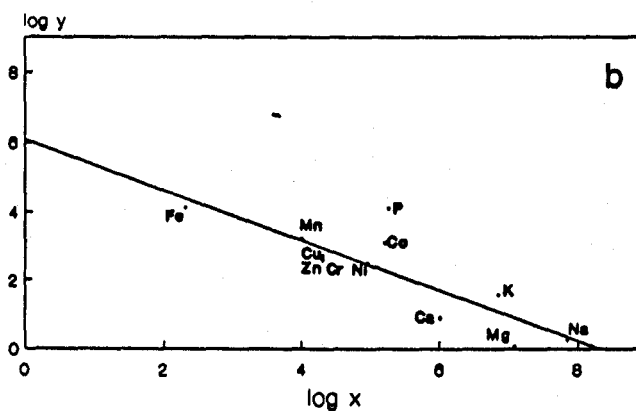
Tabla 9. Contenido en microelementos de los tres lotes analizados de cada producto elaborado a partir de microalgas (mg/Kg peso seco).

Muestra	Lote	Ni	Co	Cu	Fe	Mn	Zn	Pb	Cd	Cr
<u>C. pyrenoidosa</u>	A	5.6	1.6	21.4	3486.0	83.7	21.4	7.2	0.2	3.9
	B	4.9	1.4	6.4	3404.7	88.4	21.0	5.1	0.0	3.4
	C	4.2	0.7	4.2	1970.9	62.8	10.3	3.3	0.2	2.9
<u>Spirulina sp.</u>	A	5.4	1.7	48.0	751.0	117.7	49.8	7.2	0.2	3.3
	B	4.5	0.9	21.6	633.6	104.9	45.8	2.1	0.0	1.2
	C	7.7	2.3	17.5	646.2	122.4	50.0	8.1	0.0	2.8
<u>S. platensis</u>	A	5.8	0.5	17.6	2016.4	64.4	28.8	4.3	0.2	7.1
	B	4.0	1.5	14.8	1614.6	67.0	18.4	3.0	0.0	4.8
	C	6.0	2.0	17.3	1631.8	63.5	20.7	7.0	0.1	5.5
<u>S. maxima</u>	A	6.1	0.9	6.5	945.0	36.0	23.8	9.2	0.2	5.0
	B	3.9	0.9	5.0	752.0	36.7	21.2	2.9	0.0	2.7
	C	5.7	0.8	4.6	822.6	32.8	21.6	5.6	0.2	4.0

$$\log a = 5.77 \quad b = -0.68 \quad r = -0.82$$



$$\log a = 6.08 \quad b = -0.73 \quad r = -0.84$$



$$\log a = 5.76 \quad b = -0.68 \quad r = -0.79$$

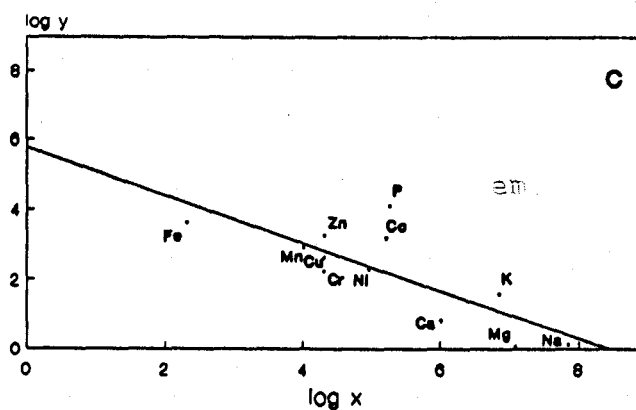
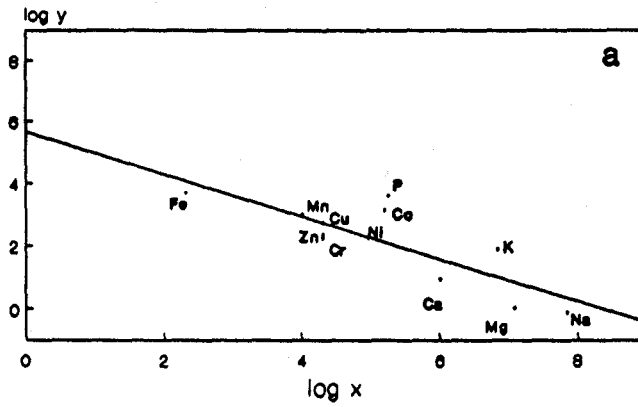
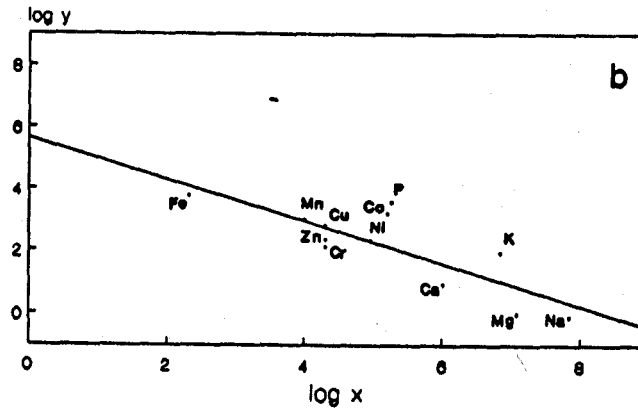


Figura 2. Representación gráfica de $\log y$ frente a $\log x$ y parámetros de la recta de regresión (véase texto) para los tres lotes analizados del producto "Wakame".

$$\log a = 5.66 \quad b = -0.67 \quad r = -0.81$$



$$\log a = 5.65 \quad b = -0.67 \quad r = -0.81$$



$$\log a = 6.59 \quad b = -0.83 \quad r = -0.88$$

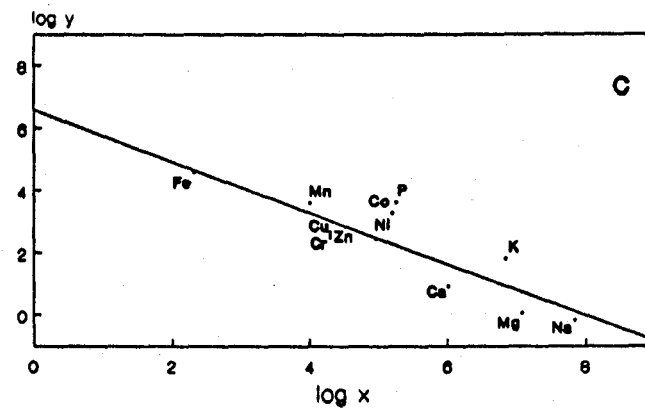
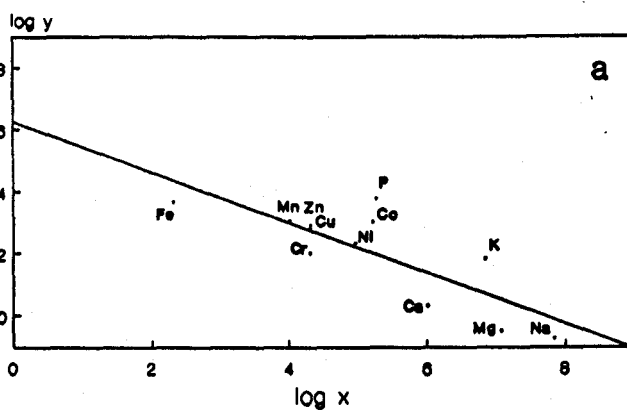
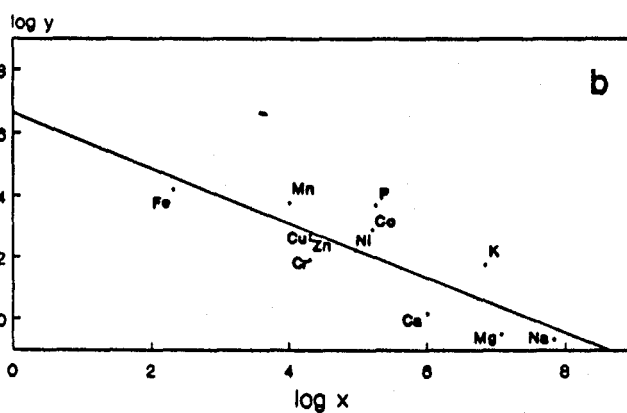


Figura 3. Representación gráfica de log y frente a log x y parámetros de la recta de regresión (véase texto) para los tres lotes analizados del producto "Hijiki".

$$\log a = 6.25 \quad b = -0.81 \quad r = -0.80$$



$$\log a = 6.63 \quad b = -0.88 \quad r = -0.83$$



$$\log a = 6.65 \quad b = -0.89 \quad r = -0.83$$

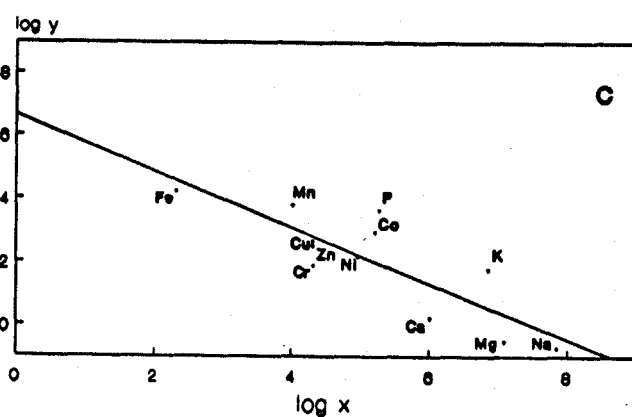
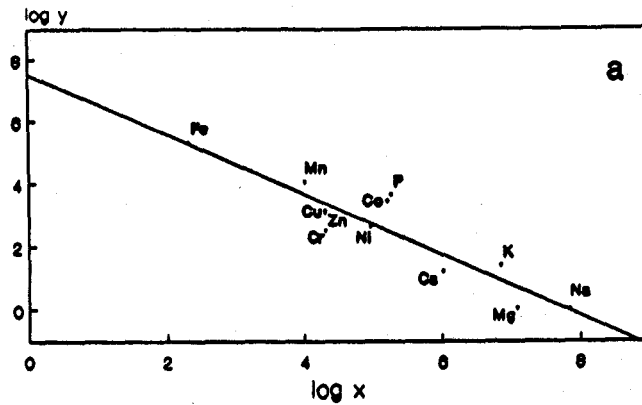
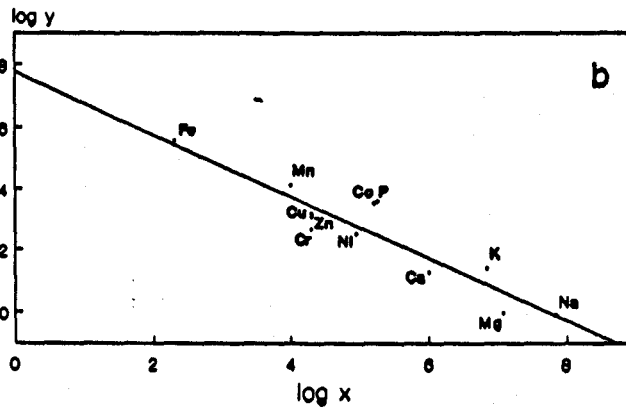


Figura 4. Representación gráfica de log y frente a log x y parámetros de la recta de regresión (véase texto) para los tres lotes analizados del producto "Dulce".

$$\log a = 7.45 \quad b = -0.95 \quad r = -0.92$$



$$\log a = 7.78 \quad b = -1.01 \quad r = 0.93$$



$$\log a = 7.26 \quad b = -0.93 \quad r = -0.91$$

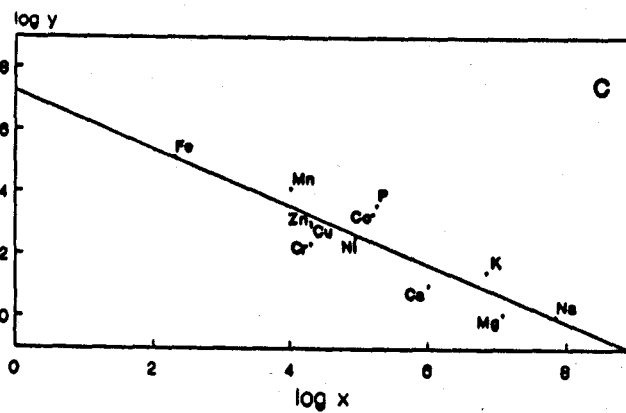


Figura 5. Representación gráfica de $\log y$ frente a $\log x$ y parámetros de la recta de regresión (véase texto) para los tres lotes analizados del producto "Fucus".

Tabla 10. Resultados obtenidos por ICP-AES (A) y por técnicas convencionales (B) en los productos analizados (mg/Kg peso seco).

Muestra		Mg	Ca	K	Na	Fe	Cu	Mn
<u>U. pinnatifida</u>	A	0.97	0.96	1.49	0.90	94	1.6	2
	B	0.85	1.23	5.10	7.93	95.3	7.7	9.9
<u>H. fusiforme</u>	A	0.52	0.97	2.05	0.92	95	2.3	ND
	B	0.53	1.41	12.43	3.32	60.3	6.5	8.0
<u>P. palmata</u>	A	0.10	0.28	2.03	0.64	177	4.3	3
	B	0.16	0.34	10.21	0.81	55.1	7.6	9.4
<u>Fucus sp.</u>	A	0.50	ND	1.16	0.90	4553	15.5	83
	B	0.55	2.60	3.69	4.29	2340	16.9	85.4
<u>C. pyrenoidosa</u>	A	0.47	0.43	0.83	0.03	4143	4.9	83
	B	0.45	0.48	0.92	0.03	3486	21.4	83.7
<u>Spirulina sp.</u>	A	0.35	ND	0.75	0.90	590	20.4	113
	B	0.34	0.96	1.90	1.36	751	48	117.7
<u>S. platensis</u>	A	0.33	0.96	0.95	0.89	1644	14.3	61
	B	0.50	1.54	1.65	1.77	2016	17.6	64.4
<u>S. maxima</u>	A	0.48	0.83	0.89	0.07	1059	3.5	36
	B	0.46	0.69	1.13	0.12	945	6.5	36

En la Figura 6 aparecen representados los valores de las relaciones P/Ca, N/P y Na/K para cada producto, índices de la calidad nutricional de la materia mineral de los preparados.

Además del análisis mediante técnicas analíticas convencionales, se analizaron las muestras mediante ICP-AES. En la Tabla 10 aparecen los resultados de los análisis de un lote de cada muestra para los elementos mayoritarios Mg, Ca, K y Na, y los minoritarios Fe, Cu y Mn, frente a los obtenidos con las técnicas analíticas convencionales. Se observó para algunos elementos una buena correspondencia con los valores obtenidos por otras técnicas. Sin embargo, se presentaron problemas de interferencias de matriz, de límites de detección en un análisis multielemental y de concentraciones inadecuadas en algunos casos de los patrones naturales utilizados. Estos problemas se reflejaron en la disparidad entre algunos resultados obtenidos mediante ICP-AES y los correspondientes a las técnicas convencionales (por ejemplo para K y Na). Asimismo, impidieron el análisis del resto de los elementos analizados por las otras técnicas.

IV.2.1. "Wakame".

El producto con Undaria pinnatifida resultó ser el que contenía más Na de los productos estudiados. Dentro de las macroalgas, el contenido medio en N de este producto también fue el más alto, probablemente debido a su mayor contenido proteico, al igual que el de P. Los elementos minoritarios más abundantes fueron Fe, Mn y Zn. Las diferencias en la composición mineral entre lotes distintos fué más acusada para los elementos Mg, Na, Fe y Zn. Destacan los altos contenidos en Fe (149.5 mg/Kg) y Zn (69.1 mg/Kg) de los lotes B y C, respectivamente.

La composición mineral del producto es similar en líneas generales a la publicada previamente para U. pinnatifida ^{3,22,32}. Los valores publicados para los elementos K (1.6-5.52 g/100g),

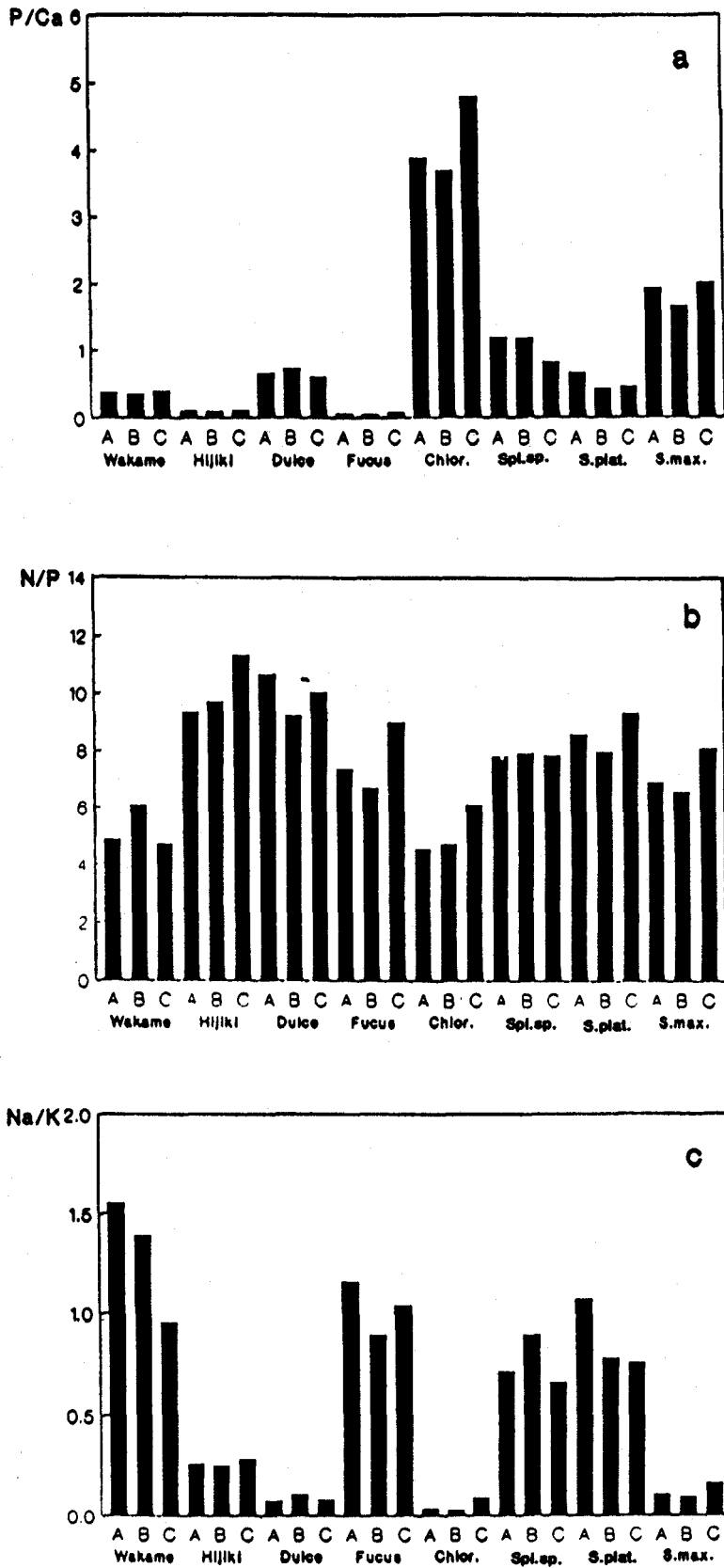


Figura 6. Relaciones P/Ca (Fig. 6a), N/P (Fig. 6b) y Na/K (Fig. 6c) de los distintos lotes de los productos estudiados.

P (0.195-0.58 g/100g), N (1.56-2.05 g/100g) y Ca (1.162-1.300 g/100g) se corresponden con los observados en estos productos. En cambio, fueron inferiores los niveles de Mg (0.597-0.854 g/100g frente a 3.05 g/100g) y de Fe (48.5-149.5 mg/Kg frente a 103-430 mg/Kg) del producto analizado. Asimismo, el contenido en los metales Cu, Pb y Cd fué superior al publicado (3.5 mg/Kg, 0.41 mg/Kg y 0.42 mg/Kg, respectivamente).

IV.2.2. "Hijiki".

Los elementos más abundantes en el producto con Hijikia fusiforme fueron K y Na, dentro de los elementos mayoritarios, y Fe, Mn y Zn, dentro de los minoritarios. Este producto presentó en general una escasa variabilidad entre lotes para los elementos mayoritarios: En cambio, los valores para los elementos minoritarios mostraron en determinados casos una gran variación: Fe (60.3-472.9 mg/Kg), Mn (8.0-30.2 mg/Kg) y Pb (5.1-13.8 mg/Kg). El lote C resultó ser el que presentaba más alto contenido en 6 de los 9 elementos minoritarios analizados. Esto se reflejó en diferencias en los valores log a, b y r del lote (Fig. 3).

Existen también diferencias con la composición de H. fusiforme publicada previamente ³². Las diferencias radican en el contenido de Na (1.69 g/100g), K (3.43 g/100g), Mg (0.99 g/100g) y Zn (80 mg/Kg) encontrado por estos autores. En cambio, los valores publicados para Ca (1.72 g/100g), P (0.09 g/100g) y Fe (160 mg/Kg) son similares a los detectados en el producto "Hijiki".

IV.2.3. "Dulce".

P. palmata se caracteriza por tener niveles de K y P altos en comparación a los de otras macroalgas marinas, así como bajos contenidos en elementos alcalinotérreos ¹⁰. El producto "Dulce" analizado contenía como elementos más abundantes K y

N, dentro de los elementos mayoritarios, aunque "Wakame" contenía más P. Al igual que los demás productos con macroalgas, Fe, Mn y Zn fueron los minoritarios más abundantes. Este fué el producto a base de macroalgas con menor contenido en Ca, Mg y Na, lo que está de acorde con su relativo bajo contenido en cenizas (Tabla 5) y con los resultados publicados para P. palmata, cuyo contenido en Ca puede ser incluso inferior al del agua circundante. Los valores publicados para Mg y Na (0.39-0.5 g/100g y 2.07-2.5 g/100g, respectivamente ¹⁰) son, sin embargo, superiores a lo observado en el presente producto. En cambio, los resultados para P, K y Ca sí se encuentran dentro de los intervalos publicados para P. palmata (0.25-0.56 g/100g para P, 2.22-12.2 g/100g para K, y 0.11-1.25 g/100g para Ca ¹⁰).

Las mayores diferencias entre lotes se dieron en los elementos minoritarios Fe, Mn y Zn, siendo de hasta 4 veces las diferencias entre los valores de los distintos lotes. Esto no es sorprendente dada la variabilidad que muestran los distintos análisis en la literatura ^{10,52}. El contenido en Pb, Cd y Cr fué el más bajo dentro de los productos a base de macroalgas analizados. Estos valores y los obtenidos para los metales Cu, Fe y Zn son además inferiores a los detectados en P. palmata por otros autores ^{10,52}, que incluyen, por ejemplo, altos niveles de Zn (hasta 200 mg/Kg), Cu (hasta 48 mg/Kg) y Cr (34 mg/Kg). Aparentemente no existen en la literatura valores para el contenido en Ni de esta especie.

IV.2.4. "Fucus".

Este producto presentó niveles intermedios de elementos mayoritarios dentro de los productos analizados, con la excepción de S, cuyo contenido fué el más alto. Los elementos mayoritarios más abundantes fueron S, K, Na y Ca, dándose una escasa variación entre lotes en el contenido de este grupo de elementos, así como en los elementos minoritarios.

El producto elaborado con algas del género Fucus es el que presentó mayor concentración en todos los elementos minoritarios de los productos de macroalgas estudiados. También presentó en general valores superiores a los de los productos con microalgas, aunque para determinados elementos (Fe, Cu y Mn) se dieran contenidos más elevados en las últimas. Esto no es sorprendente dado que las distintas especies de este género se utilizan como indicadores de contaminación con metales pesados, debido a su resistencia y capacidad de acumulación. Se han descrito en Fucus altos niveles de Ni (1.6-6 mg/Kg), Cu (1.7-107 mg/Kg), Mn (33-800 mg/Kg), Zn (21-37000 mg/Kg), Pb (0.5-163 mg/Kg), Cd (0.4-20.8 mg/Kg), y Cr (1-4 mg/Kg) ^{31,52,53}. En el producto analizado los valores para Ni y Cr superaron a los encontrados en la literatura.

IV.2.5. "Chlorella".

El contenido en N, Na y Ca de este producto fué el más bajo dentro de los productos con macroalgas. Asimismo, el contenido en Fe de dos de los tres lotes analizados fué el más alto. Las diferencias entre lotes fueron más acusadas en los elementos Fe, Cu y Zn. El contenido en C, H, N, O y S fué el típico para una microalga, con un valor de R superior a las de las macroalgas ⁵⁴. El valor de R obtenido para este producto es un valor intermedio dentro del intervalo observado por Spohr y Milner en Chlorella pyrenoidosa ⁵⁴.

Chlorella quizás sea uno de los géneros de algas con los que se han realizado más estudios fisiológicos sobre la toma de metales pesados. Se han estudiado tanto los mecanismos pasivos y activos de acumulación de distintos metales pesados por Chlorella ⁵⁵⁻⁵⁹, aunque se presentan a menudo los datos en la literatura de formas muy diversas, resultando difíciles de comparar: mg/g proteína ⁵⁹, mol ion metálico/g células ⁶⁰, mol/célula ⁵⁸, µg/mg ^{56,61,62}. Las dificultades asociadas a la correcta estimación de las cantidades presentes en el medio y

de las acumuladas por las células añaden complejidad a la comparación de los distintos estudios ⁵⁵. Se han determinado, por ejemplo, los factores de concentración (razón entre concentración de metal en el alga en $\mu\text{g/g}$ peso seco y concentración en el medio en $\mu\text{g/l}$) en condiciones de laboratorio para Cd (86-32000) ⁵⁵ y Hg (24000-47000) ⁴. Chlorella puede acumular en condiciones de laboratorio hasta 8000 mg/Kg de Cd ^{56,62}, 30000 mg/Kg de Ni ⁵⁶ y 55000 mg/Kg de Hg ⁵⁶, aunque la concentración de un determinado metal en el alga varía según la concentración del mismo en el medio de cultivo, y el intervalo de concentraciones en el medio utilizadas en estos experimentos es superior al de las concentraciones encontradas en la naturaleza. Después de estudiar la adsorción de metales pesados por distintas fracciones de la biomasa de Chlorella regularis, Nakajima et al. ⁶⁰ han sugerido que en este alga la toma de los iones metálicos es dependiente de la adsorción a proteínas. Según este estudio, el grado de adsorción para cada metal por las células decrece según el siguiente orden: $\text{UO}_2^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \geq \text{Ba}^{2+} = \text{Mn}^{2+} \geq \text{Co}^{2+} = \text{Cd}^{2+} \geq \text{Ni}^{2+} = \text{Sr}^{2+}$.

En contraposición a la abundancia de estos estudios fisiológicos, existen escasos datos en la literatura sobre el contenido en metales de poblaciones naturales de Chlorella y de microalgas en general. Esto se debe a las dificultades asociadas a la determinación en ellas del contenido en metales pesados ³¹, tales como presencia de partículas de sedimentos en suspensión, difíciles de eliminar, y la diferente capacidad de acumulación de las distintas especies que forman la comunidad planctónica. Sorprendentemente, los datos sobre la composición mineral de Chlorella cultivada a gran escala son también escasos en la literatura. Los estudios sobre la contaminación por metales pesados de la biomasa de microalgas dirigida al consumo como alimento humano o animal se han centrado en los géneros Scenedesmus ⁶³⁻⁶⁷ y Spirulina (ver siguiente apartado). Yannai et al. ⁶⁸ cultivaron las microalgas Chlorella, Scenedesmus y Micractinium en aguas residuales para la alimentación de animales. El contenido de Chlorella fué 24.2

mg/Kg de Cu, 1.4 mg/Kg de Cd y 8.1 de Pb, valores todos ellos superiores a los obtenidos en el producto analizado en este trabajo, aunque el contenido en Cu y Pb del lote A fué muy parecido.

IV.2.6. "Spirulina".

Los tres productos con Spirulina analizados presentaron una composición parecida en elementos mayoritarios, con la excepción del bajo contenido en Ca y sobre todo Na del producto con S. maxima. El alto contenido de los elementos del grupo I y II en Spirulina no es sorprendente dada la alcalinidad necesaria para el cultivo de este alga. Spirulina concentra además la mayoría de los elementos presentes en el medio, con la excepción de Na, que es excluido activamente de las células ⁶⁹. Las cianobacterias pueden ser acumuladores eficientes, excretando agentes quelantes (hidroxamato) que pueden actuar como moléculas transportadoras o incrementar la reserva disponible del elemento en la zona próxima a la superficie celular ²⁷. La capacidad de acumulación de Spirulina puede ser beneficiosa al considerar los elementos requeridos en la dieta humana, pero problemática si se encuentran presentes metales eminentemente tóxicos.

Los elementos minoritarios más abundantes fueron Cu, Fe, Mn y Zn. El producto con Spirulina sp. fué el que más contenido presentó en Cu, Mn y Zn, mientras que los contenidos mayores en Fe se dieron en el producto con S. platensis. En general, las diferencias entre lotes no fueron significativas, tanto para los elementos mayoritarios como para los minoritarios. En el producto con Spirulina sp., se observaron ciertas diferencias entre lotes para Cu.

A diferencia de Chlorella, existen abundantes datos sobre la composición mineral de Spirulina cultivada a gran escala. Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los amplios intervalos publicados para los elementos mayoritarios ⁷⁰⁻⁷³:

P (0.50-3.90 g/100g), K (0.23-1.87 g/100g), Ca (0.13-2.60 g/100g), Mg (0.19-0.90 g/100g) y Na (0.04-1.38 g/100g).

Las diferencias obtenidas en los distintos productos para los elementos minoritarios confirman que no existen niveles "característicos" para estos productos ²⁷, dependiendo el contenido de las condiciones de cultivo utilizadas. Los resultados son similares a lo publicado ^{72,73}: Ni (2.5-12.9 mg/Kg), Co (1.9 mg/Kg), Cu (2.6-16 mg/Kg), Mn (13-205 mg/Kg), Zn (24.1-185 mg/Kg), Cr (2.2-6.5 mg/Kg). El producto con S. platensis superó los 500-1000 mg/Kg de Fe que presentan la mayoría de los productos con Spirulina ²⁰.

Con respecto a los metales tóxicos analizados, los bajos niveles de Cd concuerdan con los de la literatura ^{70,72,74-76}. En cambio, los valores obtenidos para Pb en algunos lotes son altos en comparación con los detectados anteriormente en Spirulina: 0.4-6.7 mg/Kg ^{72,74-76}. Incluso los 7.3 mg/Kg encontrados en lotes de productos de Taiwan por distintos laboratorios ²⁷ se sobrepasan en algunos lotes analizados en el presente trabajo.

IV.3. Discusión.

IV.3.1. Análisis por ICP-AES.

El interés de esta técnica radica en que permite el análisis de distintos elementos de una misma muestra a la vez, con límites de detección y sensibilidad comparables para muchos elementos a los de otras técnicas comunmente utilizadas (Ej: activación neutrónica, fluorescencia de rayos X y absorción atómica) ⁷⁷, por lo que supone una gran ventaja a la hora de manejar un gran número de muestras. Su aplicación a las muestras biológicas ha aumentado considerablemente en los últimos años ⁷⁸, hasta tal punto que, por ejemplo, la FDA (Food and Drug Administration) y la EPA (Environmental Protection

Agency) norteamericanas ya la utilizan para el análisis elemental de diversos productos agrícolas ⁷⁹.

En algunos casos la técnica de ICP-AES se ha utilizado para el análisis de algas ^{72,52}. Johnson y Shubert ⁷² encontraron altos niveles de Hg (9 mg/Kg) en productos comerciales de Spirulina utilizando esta técnica analítica, garantizando sus resultados para este elemento con el análisis de un standard certificado NBS ("National Bureau of Standards"), aunque no se dieron datos a este respecto para los otros 16 elementos analizados. Según Jassby ²⁷, estos resultados para Hg son contradictorios con los resultados (sin publicar) de numerosos análisis por absorción atómica del Centro de Análisis de Alimentos de Japón, en los que el contenido de Hg nunca fué superior a 1 mg/Kg. La compañía fabricante del aparato de ICP-AES utilizado por Johnson y Shubert no detectó Hg en productos similares de Spirulina. Jassby ²⁷ indica además, basándose en una comunicación personal de E. Shubert, que esos autores no pudieron reproducir sus resultados con posterioridad.

Esta técnica presenta problemas en cuanto a la dificultad de su puesta a punto para el análisis de materiales relativamente poco conocidos, como los que nos ocupan. Utilizar patrones lo más parecidos a las muestras a analizar y evitar interferencias espectrales son problemas críticos a resolver para la obtención de resultados fiables. Estos problemas inherentes a la puesta a punto de esta técnica hicieron que fuera imposible la aplicación sistemática de la misma para la determinación de elementos mayoritarios y minoritarios en todos los lotes de los productos sin escapar de los objetivos de una tesis no centrada en esta difícil técnica analítica.

IV.3.2. Relación entre log x y log y en los productos con macroalgas.

A pesar de la variabilidad observada en la composición mineral entre lotes, sobre todo para determinados elementos, pudo observarse una relación entre log x y log y distinta para cada producto, definida por los parámetros de la recta de regresión. Este hecho está acorde con lo observado por Yamamoto et al. ³², quien propuso la utilización de estos parámetros para caracterizar la distribución de los elementos en cada especie. Los valores utilizados de concentración en el agua marina y tiempo de residencia oceánica son valores teóricos, obtenidos a partir de tablas que en algunos casos pueden no reflejar la situación real del sitio de procedencia del alga. Además, la correlación detectada, aunque estadísticamente significativa ($p < 0.005$), no implica una relación causal, que sólo puede establecerse en base a una experimentación. A pesar de estas dificultades, la aplicación de éstos cálculos a los productos analizados guarda similares características a lo observado por Yamamoto et al. ³², que aplicaron estos cálculos a los resultados de la composición mineral de 18 especies distintas de macroalgas marinas, obtenidos a su vez por distintos autores en especímenes de muy diversa procedencia.

En los estudios sobre la composición mineral de las macroalgas marinas es común el lavado para eliminar las posibles "contaminaciones" debidas a material adherido a la superficie del alga. En el presente estudio, los análisis se realizaron sin un lavado previo. Cuando el destino del producto es el de ser consumido como sopa, elaborando ésta a partir del alga tal y como viene en el envase, el lavado previo hubiera enmascarado la composición real del alimento. Una simple inspección visual de los productos reveló la falta de tal lavado antes del envasado. Este hecho puede explicar la diferencia entre los coeficientes de correlación obtenidos en las Figs. 2, 3 y 4 (sobre -0.8) y los obtenidos por Yamamoto

et al. ³² (-0.9 o menor para la mayor parte de las especies, no siendo superior a -0.88 en ningún caso). Nuestros resultados sugieren que el análisis de estos productos refleja también esa parte de elementos minerales adsorbidos en la superficie del alga y no debida a ningún proceso metabólico, enmascarando así la relación de tipo exponencial entre la reactividad bioquímica de cada elemento dentro del alga (factor de concentración) y la reactividad geoquímica en el océano (tiempo de residencia oceánica) de los elementos.

En cambio, el coeficiente de correlación obtenido para el producto "Fucus" (de -0.91 a -0.93) sí coincide con los valores de la literatura. Este producto, a diferencia de los otros productos elaborados con macroalgas, se presentaba como comprimidos que además incluían almidón. Probablemente en la elaboración del producto sí hubo ese lavado en agua, por lo que esa proporción de elementos adheridos fueron eliminados. Es de destacar que este producto fué el que más contenido presentó en metales pesados. El alto coeficiente de correlación obtenido para los lotes de este producto sugiere que la posible contribución debida al proceso de fabricación no afecta a la distribución general de los elementos en el alga. Estas consideraciones sugieren además que las características del producto alimenticio elaborado a partir de algas marinas que llega al consumidor pueden diferir de las observadas en las mismas algas en estudios concebidos desde otra óptica científica, como por ejemplo en estudios ambientales.

IV.3.3. Contenido en C, H, O, N y S.

La proporción de estos elementos en los productos fué marcadamente distinta entre las macroalgas y las microalgas. Esto se tradujo en distintos valores de R. Este parámetro expresa el nivel de reducción del contenido total de materia orgánica de un material vegetal, y es proporcional al calor de combustión del mismo, por lo que en definitiva indica su

contenido energético ²³. Cuanto mayor es R, mayor es el calor de combustión. La escala de los valores de R oscila entre 0 del dióxido de carbono y 100 del metano. El menor valor de R en las macroalgas puede deberse a la alta proporción de poliuronido en sus carbohidratos, con un R bajo (22.7). En el valor de R del producto "Fucus" obviamente ha influido la presencia de almidón (R = 29.7). La presencia de mayores cantidades de lípidos y proteínas (con R altos) en la microalgas dió lugar a mayores valores de R.

Spoehr y Milner ⁵⁴ estudiaron la composición elemental en 320 cultivos distintos de Chlorella pyrenoidosa (estirpe de Emerson) incubados en distintas condiciones de luz, nutrientes y temperatura, obteniendo unos valores de R que oscilaron entre 38 y 96. Sin embargo, estos autores no incluyeron en el estudio las condiciones de cultivo heterotróficas, probablemente utilizadas en la producción de la biomasa que constituía el preparado analizado en el presente trabajo (ver secciones II y VI).

IV.3.4. Minerales y electrolitos.

Los productos analizados contenían cantidades apreciables de los elementos requeridos en la dieta humana (Tabla 4). Sin embargo al considerar exclusivamente esta fracción de la biomasa algal debe tenerse en cuenta el alto coste de estos productos en comparación a los suplementos comerciales de vitaminas y minerales que proporcionan cantidades superiores de todos los elementos necesitados en la dieta, con la excepción del Ca ⁸⁰.

Es significativa la diferencia de composición de elementos mayoritarios entre macro- y microalgas. Mientras que aquéllas tienen alto contenido en K y bajo en N y P, con las microalgas sucede lo contrario. Esto puede ser reflejo de diferencias en contenido en nutrientes de los hábitats de donde proceden. El N y P son elementos generalmente limitantes

en los ecosistemas naturales. El mayor contenido en P de las microalgas puede deberse a la adición de este nutriente a los estanques y lagos donde normalmente son cultivadas. El mayor contenido en N se debe a la alta proporción de proteínas típica de estos organismos. En cambio, el alto contenido en Na (al igual que el de K) en las macroalgas es atribuible a su origen marino.

Ca, P y Mg son importantes en la dieta humana dado que sus iones están implicados en el control de muchos aspectos del metabolismo. Ca es el mineral más abundante del cuerpo humano, y comprende un 1.5% del peso total ⁸¹. Prácticamente todo el calcio y el fósforo del cuerpo se encuentra en los huesos, comprendiendo la mayor parte de los componentes minerales de los mismos. El Ca libre es necesario para la coagulación de la sangre; para la contracción normal del músculo cardíaco y esquelético y para el funcionamiento de los nervios ⁸¹. El P no presente en el esqueleto forma parte de moléculas de importantes funciones bioquímicas, tales como ácidos nucleicos, ácido 2,3-difosfoglicérico y fosfolípidos.

Ca y P son los elementos con los requerimientos más altos en la dieta humana (Tabla 4): deben consumirse diariamente no menos de 400 mg de ambos. La toma recomendada para ambos es 1 g/día. Los alimentos más ricos en Ca son los productos lácteos como la leche, el queso y la mantequilla, mientras que las fuentes dietéticas importantes de P son, además de la leche y el queso, la carne, el pescado, los huevos, las leguminosas y las nueces ⁴³.

Las cantidades (en peso húmedo) que aportan la ingesta mínima diaria de Ca y P en los productos estudiados son relativamente altas considerando el uso normal de los mismos, oscilando entre 106.5 g ("Fucus") y 151.7 g ("Dulce") para Ca y entre 25 g ("Chlorella") y 324.9 g ("Hijiki") para P. Por ejemplo, 100 g de cualquiera de estos productos no alcanza el aporte en Ca de un vaso de leche. No obstante, el contenido en Ca y P de estos productos supera el de otros productos

vegetales tales como manzanas, naranjas, zanahorias, patatas y pasas ¹⁰. Los productos de microalgas incluso sobrepasan el contenido de vegetales ricos en P, como el guisante y el cacahuete.

El producto "Wakame", que resultó con unos niveles intermedios en contenido en Ca, se ha utilizado tradicionalmente en Corea como alimento en el periodo de post-parto ⁸². En experimentos con ratas, la administración oral de extractos de Undaria pinnatifida causó un incremento en la absorción intestinal de Ca y estimuló la formación y la resorción del hueso ⁸². Este hecho se puede deber al efecto sobre alguno de los diversos factores que controlan la absorción intestinal de Ca (status ácido-base, lactosa, niveles de proteínas en la dieta y flora intestinal ⁴³), más que al contenido en Ca del propio producto. El análisis de U. pinnatifida no revela cantidades significativas de vitamina D o calciferol ²², el cual supone también un factor importante en el metabolismo del calcio.

Los balances P/Ca y N/P en la dieta tiene importancia nutricional. Se necesita P para la formación del mineral del hueso en una razón de 1 g/2 g de Ca retenido y como fósforo orgánico en una razón de 1 g/17 g de N retenido ⁴³. Esto se traduce en los requerimientos de ingesta de mujeres en una relaciones P/Ca de 1.42-1.55 y de N/P de 7.12-8.51, según la edad, para alcanzar el equilibrio ⁴³. La relación P/Ca de los productos estudiados fué muy dispar, oscilando de menos de 0.5 a más de 4 (Fig. 6a). En animales una incorrecta relación P/Ca del alga puede causar anormalidades. En un estudio toxicológico y multigeneracional de 2 años sobre la ingesta del alga Scenedesmus por ratas, se observaron tras un año anomalías en la formación de los dientes ⁸³. Los autores atribuyeron estas anomalías a una inadecuada relación P/Ca en la dieta, que era de 0.75 en la dieta normal y 0.91 en el alga.

La relación N/P de los productos estudiados fué en cambio más homogénea, siendo en la mayoría en torno a 7-8. En los productos con microalgas esta relación puede ser mayor a efectos de absorción dado el elevado contenido en proteínas (fácilmente absorbibles) y la probable presencia de fosfatos inorgánicos no absorbibles.

El Mg juega un importante papel en diversas reacciones enzimáticas esenciales del organismo. Dado que Mg es un constituyente de la clorofila, las principales fuentes dietéticas de este mineral son de origen vegetal, tales como diversos cereales y legumbres ⁵⁰. Los alimentos de origen marino también contienen altas cantidades de Mg ⁴³. Se recomienda que la toma diaria de Mg sea de 400 mg, siendo 250 mg la cantidad mínima aceptable (Tabla 4). Las cantidades necesarias para cubrir estas necesidades mínimas oscilaron en los productos estudiados de 41.4 g ("Wakame") a 171.8 g ("Dulce"). A pesar de contener mucha más clorofila (Tabla 1), los productos con microalgas no presentaron un contenido en Mg mucho mayor que los productos con macroalgas. Todos los productos estudiados son ricos en este mineral, en comparación (en base a porción comestible) a otros alimentos vegetales (legumbres, zanahorias, manzanas, naranjas), cuyo contenido en Mg no suele ser mayor de 0.19%, y animales (carne, pescado y productos lácteos), con un contenido en Mg no superior a 0.04% ⁴³. Sin embargo, debe tenerse en cuenta las cantidades variables de Ca (mayor en los productos con macroalgas) y de proteínas (mayor en las microalgas), factores que disminuyen la absorción del Mg.

Los electrolitos Na y K son vitales para el mantenimiento del ambiente iónico apropiado en las células y fluidos corporales. Tienen un papel relevante en funciones fisiológicas claves del cuerpo humano, tales como generación del potencial de acción en el axón neuronal, activación de la contracción de la fibra muscular y liberación de los transmisores sinápticos ⁸¹. Los aportes mínimos aconsejados de Na y K al organismo son, respectivamente, 70 y 100 mg (Tabla

4). El contenido en estos elementos en los productos a base de algas analizados fué muy dispar: las cantidades de los productos analizados en el presente trabajo que cubren ese aporte mínimo oscilan entre 1.1 g ("Wakame") y 157.1 g ("Chlorella") para Na y entre 0.9 g ("Hijiki") y 11.3 g ("Chlorella") para K. El contenido de los productos más ricos en Na (los elaborados a partir de macroalgas "Wakame", "Hijiki" y "Fucus") superan el de alimentos ricos en este elemento, tales como aceitunas y salchichas (con contenidos entre 1 y 2.4%) ⁴³. El contenido en K en todos los productos también fué extremadamente alto en comparación con otros alimentos, tales como almendras (0.77%), espárragos (0.9%) y judías (0.42%).

El consumo de cloruro sódico ⁸⁴ y las dietas con alta relación Na/K ⁸⁵ se han relacionado con la incidencia de hipertensión. Esta a su vez es un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad coronaria ⁸⁶. En ratas, la adición de cloruro potásico a dietas con altos niveles de sal común supone una protección contra la hipertensión ⁸⁷. La razón Na/K de la dieta ejerce por tanto una importante influencia en la severidad de la hipertensión inducida por la sal ⁸⁸. Aunque con una notable variación (Fig. 6c), la relación Na/K no fué superior a 1.5 en ningún producto (excepto en un lote de "Wakame"), valor relativamente bajo si lo comparamos con el de otros alimentos ricos en Na, tales como aceitunas (43.63) y salchichas (4.89) ⁴³. El producto "Hijiki" mostró una relación Na/K notablemente baja (del orden de 0.3), a pesar de su alto contenido en Na, ya que fué el producto con más K de los productos estudiados. La relación Na/K de los productos "Dulce" y "Chlorella" también fué muy baja, en estos casos debido al menor contenido en Na (Tablas 6 y 8).

De los tres productos con Spirulina estudiados, fué el de S. maxima el que presentó con diferencia la relación Na/K más baja, debido al menor contenido en Na, 10 veces inferior (Tabla 8). Na es el único elemento que no es acumulado por Spirulina, siendo la concentración inferior en las células que

en el medio de cultivo, a diferencia de K, que se acumula en las células hasta una concentración 10 veces superior a la de Na ⁶⁹. Esto está de acuerdo con lo observado en el producto con S. maxima. Asimismo, el contenido celular de Na en Spirulina permanece constante independientemente de la concentración de Na en el medio, lo cual indica la existencia de mecanismos que expulsan los iones de sodio de las células ⁶⁹. Esto sugiere que estas diferencias en las relaciones Na/K entre los productos estudiados se deben a componentes del medio de cultivo (sales de sodio normalmente utilizadas en la formulación del mismo ⁷⁰) que no han sido lavados durante el procesado de la biomasa que forma parte de los preparados de Spirulina sp. y S. platensis. Los fenómenos de evaporación, muy comunes en el cultivo a gran escala al aire libre, junto con la expulsión del Na de las células y la sucesiva recogida de la biomasa algal, pueden producir un incremento progresivo en la concentración de Na en el medio que repercute en la relación Na/K final del producto, en el caso de que esos componentes del medio no sean eliminados durante el procesamiento de la biomasa. El bajo contenido de Na en Spirulina es una propiedad aludida en algunas ocasiones en la propaganda de este tipo de productos. Aunque biológicamente es cierto, se observa que a veces el producto que llega al consumidor difiere de esas características "ideales" proclamadas a los consumidores a partir de estudios científicos serios.

IV.3.5. Elementos traza.

Es de destacar el alto contenido en Fe de algunos productos, para ser de origen vegetal. El contenido en Fe de estos productos supera en un orden de magnitud al contenido en Fe de otros alimentos, tanto animales como vegetales, incluso comparando en base a peso seco ²⁰. En humanos, el hierro se presenta como hierro esencial, por ejemplo hemoglobina y mioglobina, y como reserva de hierro mobilizable, ferritina y homosiderina. La mayor parte del hierro del cuerpo se presenta en los glóbulos rojos. La deficiencia en Fe puede producir

anemia, dado que es esencial para la síntesis de la hemoglobina ⁸¹.

A veces es difícil e incluso imposible determinar cuánto de un nutriente químicamente presente en un alimento está biológicamente disponible al consumidor ⁸⁹. El hierro se absorbe de la dieta tanto en forma hémica como no hémica. La absorción del hierro hémico es independiente de la composición del resto de la dieta, mientras que ocurre lo contrario con el hierro no hémico, que constituye el 60% del hierro en los tejidos animales y casi el 100% en los alimentos vegetales, y es absorbible en un 13-35% en comparación al Fe hémico ^{20,43}. En el caso de Spirulina, Johnson y Shubert ⁹⁰ demostraron en experimentos con ratas que el hierro no hémico presente en su biomasa es muy bien absorbido. Estos autores consideraron que los productos con Spirulina son una fuente concentrada de Fe, aún habiendo encontrado cantidades inferiores a las detectadas en el presente trabajo. Aunque las cianobacterias no tienen cantidades significativas de hemo, tienen un tetrapirrol lineal relacionado llamado ficocianobilina. La ficocianobilina forma normalmente un compuesto llamado ficocianina al estar unida a una proteína. La ficocianobilina puede formar complejos solubles con Fe y otros minerales bajo condiciones que asemejan a la digestión, que posiblemente facilitan la absorción de los mismos ²⁰.

A su vez, la mayor parte de los lotes de los productos "Fucus" y "Chlorella" analizados presentaron mayores cantidades de Fe que los productos con Spirulina. Tomando la media del contenido en Fe de los tres lotes de cada producto, las cantidades de producto que proporcionan la dosis diaria recomendada para el hombre (Tabla 4) son 5.9 g para "Fucus", 5 g para "Chlorella", y 21.6 g, 8.6 g y 18 g para los productos con Spirulina sp., S. platensis y S. maxima, respectivamente. Esas cantidades se corresponden con las recomendadas por los fabricantes en el caso de los dos primeros productos (ver sección II). No obstante, la presencia de cantidades variables de Ca y P (que disminuyen la absorción de Fe de la dieta ⁹⁰) en

la misma biomasa del alga (ver Tablas 6 y 8), la forma química de Fe en la misma y la composición de otros alimentos tomados conjuntamente con el alga pueden influir en la disponibilidad de ese hierro.

El Zn es un elemento traza necesario para la actividad de importantes enzimas. La ingesta mínima recomendada de Zn es 5 mg/día (Tabla 4). Las cantidades necesarias de los productos analizados para cubrir este requerimiento son quizás superiores al uso aconsejado a los consumidores (de 111.2 g en el producto con Spirulina sp. a 514.5 en "Dulce"). No obstante, su contenido en Zn puede considerarse alto si lo comparamos con el contenido de otros alimentos ricos en Zn, tales como pescado (25 mg/Kg), muslo (28 mg/Kg) y pechuga (11 mg/Kg) de pollo. El zinc es sin embargo más absorbido probablemente en los alimentos de origen animal ⁴³.

Las deficiencias dietéticas en Cu son raras. El requerimiento diario mínimo de Cu es inferior a 1 mg. Los productos analizados presentaron diferencias patentes en el contenido en Cu entre sí y entre los distintos lotes del mismo producto. Algunos de ellos contuvieron cantidades equiparables a las de alimentos ricos en Cu tales como diversos productos secos (7.8-23.8 mg/Kg) e hígado de ternera (11 mg/Kg).

El contenido en Mn de los productos analizados también fué alto en comparación a otros alimentos: granos y cereales (1.17-30.76 mg/Kg) y nueces (0.38-35.09 mg/Kg). Especialmente los productos "Fucus", "Chlorella" y los elaborados con Spirulina sp. y S. maxima contuvieron cantidades que con un consumo no demasiado alto (de 27 a 38 g/día) cubren las necesidades mínimas diarias de ese elemento.

Los requerimientos dietéticos del resto de los elementos traza analizados (Co, Ni y Cr) son menos conocidos. El contenido en Co de algunos productos fué elevado en comparación con alimentos de origen marino, ricos en este metal (1.56 mg/Kg). También fué superior el contenido en Cr al

de carne y productos lácteos (0.1 mg/Kg) y legumbres, frutos y cereales (0.02-0.05 mg/Kg).

IV.3.6. Niveles de metales pesados.

Es difícil encuadrar estos productos dentro de la legislación española (e internacional) sobre límites de metales pesados en alimentos, ya que se trata de productos de origen vegetal pero que proceden de hábitats acuáticos, como costas y lagos, donde la concentración de metales pesados tiende a ser superior a la de otros ambientes. La variación encontrada entre distintas muestras dificulta además la generalización de las conclusiones. Asimismo, cualquier consideración sobre la posible toxicidad debida al contenido en metales pesados de este tipo de productos tiene la dificultad de que éstos no suponen normalmente una cantidad apreciable en la dieta, por lo que es bastante improbable un efecto tóxico debido a la ingesta de los mismos, a no ser después de un consumo continuado de cantidades significativas.

De los metales estudiados, sólo Pb y Cd se consideran no esenciales, siendo además los más tóxicos. Los límites marcados por la legislación española en productos de pesca son 3 mg/Kg para Pb y 1 mg/Kg para Cd (Tabla 4). Aunque existen diferencias entre lotes, la mayor parte de los productos analizados sobrepasan (en peso húmedo) este límite para Pb. El producto "Chlorella" también sobrepasa el límite recomendado por los fabricantes japoneses para este tipo de productos. Lo contrario pasa para los productos con Spirulina. Determinados lotes de productos de microalgas también sobrepasan los límites de Pb recomendados para la proteína de microorganismos. Sin embargo, en el caso de los productos con dosis recomendadas por los fabricantes ("Fucus", "Chlorella" y "Spirulina" - ver sección II), no se sobrepasa la toma semanal tolerable de Pb (Tabla 4). Con el resto de los productos, las cantidades necesarias para llegar al límite tolerable de toma diaria de Pb (tomando los valores medios de Pb de los tres

lotes) son 112 g para "Wakame", 66.6 g para "Hijiki" y 139.1 g para "Dulce".

Algunos estos productos presentan mayor contenido en Cd que la media de las comidas vegetales y pescado ⁹¹, aunque sólo en los productos "Wakame" e "Hijiki" se sobrepasa el límite establecido en España para los productos de pesca (1 mg/Kg). En estos casos, las cantidades de producto necesarias para alcanzar el límite recomendado de ingesta diaria de Cd (66-83 µg) es 67.2-78.4 g para "Wakame" y 40-50 g para "Hijiki".

En cuanto al resto de los metales pesados analizados, sólo el Cu tiene un standard legal en los productos de pesca (20 mg/Kg), standard sobrepasado por algunos lotes de productos con microalgas. Sin embargo, las cantidades necesarias para aportar cantidades potencialmente tóxicas son excesivas, del orden del Kg. Lo mismo sucede al considerar el relativo alto contenido de Mn en los productos "Fucus" y los constituidos por microalgas. Se necesitarían cantidades muy por encima de las recomendadas a los consumidores. Tampoco exceden estos productos las recomendaciones de la O.M.S. para el resto de los metales pesados analizados.

Los posibles efectos toxicológicos del alto contenido en metales pesados de algunos productos con algas, especialmente los de microalgas, han sido intensamente estudiados con experiencias con animales ²⁶. En ninguna de ellas se pudo observar una acumulación apreciable en los tejidos de los animales utilizados en los experimentos (ratas, gallinas, carpas), ni tampoco algún retraso del crecimiento. Esto puede explicarse por el alto contenido en P de las algas utilizadas en los experimentos, que forma fosfatos de metales que no pueden ser absorbidos en el tracto gastrointestinal de los animales. Bajo las condiciones alcalinas utilizadas para el cultivo de las microalgas (especialmente Spirulina), y en presencia de iones fosfatos y sulfatos, Pb y Cd forman compuestos ligeramente solubles que precipitan o flotan adheridos a pequeñas partículas en el medio de cultivo. En la

recogida de la biomasa, la mayoría de estas sales pueden ser también recolectadas junto con el alga, y consecuentemente permanecen en ella después del secado. Por tanto, los altos niveles de Pb detectados en algunos de los productos analizados en este trabajo pueden no ser tóxicos, en primer lugar, considerando un uso normal de estos productos, y en segundo, por la forma química poco absorbible en la que los metales pesados pueden estar presentes en la biomasa algal. El producto "Fucus" quizás sea el único que pueda escapar a estas dos consideraciones, dado que se trata de un producto de macroalga, donde además el nivel de P es inferior que en los productos con microalgas. La distribución de los elementos en el producto (Fig. 5) sugiere un lavado del alga, por lo que los elementos presentes en el alga han sido tomados debido a su reactividad bioquímica, y probablemente pueden estar en una forma biológicamente más disponible.

V. HIDRATOS DE CARBONO: AZUCARES NEUTROS.

V.1. Introducción.

Los hidratos de carbono presentes en las algas se encuentran como azúcares libres, formando parte de diversas macromoléculas (como ADN y ARN) o en forma de polisacáridos. Estos últimos son cuantitativamente los hidratos de carbono más importantes en la algas. Las diversas formas en las que se unen hexosas (por ejemplo glucosa, galactosa y manosa), pentosas (como xilosa y arabinosa), desoxihexosas (ramnosa y fucosa) y ácidos urónicos (glucurónico, manurónico y gulurónico) permiten la elaboración de un vasto número de polisacáridos con distintas estructuras y, por consiguiente, con diferentes propiedades.

Los polisacáridos cumplen en las algas esencialmente dos funciones: por un lado, son productos de reserva, y, por otro, constituyen importantes estructuras de la pared celular y de los espacios intercelulares.

V.1.1. Polisacáridos de reserva.

Los polisacáridos de reserva más importantes en las algas son poliglucanos, es decir, polímeros de glucosa. En ellos los monómeros pueden estar unidos por enlaces α -1:4 o β -1:3. Ejemplos de poliglucanos α -1:4 son el almidón de florídeas, típico de la rodofíceas, y el glucógeno presente en las cianobacterias. Los poliglucanos β -1:3 pueden encontrarse, por ejemplo, en forma de laminarano, en las feofíceas, de paramilón, en las euglenofíceas, o de crisolaminarina, en diatomeas y algunas crisofíceas ⁹². Los distintos tipos de poliglucanos se diferencian unos de otros en características tales como longitud de la cadena básica, organización de los gránulos que forman, susceptibilidad a enzimas hidrolíticas, etc.

Sólo en determinados casos se encuentran en las algas polisacáridos de reserva distintos a los poliglucanos. Por ejemplo, un polímero de fructosa es el material de reserva en los 10 géneros pertenecientes al orden Dasycladales ⁹². Asimismo, en Palmaria palmata el polisacárido más abundante es un xilano probablemente con funciones de material de reserva ⁹³.

V.1.2. Polisacáridos estructurales.

Los principales constituyentes orgánicos de las paredes celulares de las algas son polisacáridos. En general, las paredes celulares algales están formadas por dos componentes, uno fibrilar y el otro mucilaginoso. Este último forma una matriz paracristalina donde está inmerso el primero, constituido por microfibrillas que forman la parte más inerte y resistente de la pared celular. Según los distintos grupos de algas, los polisacáridos que forman estas estructuras pueden ser de diversas clases ⁹⁴. Por un lado, están los polisacáridos neutros, como celulosas, mananos y xilanos, y, por otro, polisacáridos ácidos, representados por polímeros de ácidos urónicos y polisacáridos sulfatados.

En analogía a las plantas superiores, donde está extendida la presencia de celulosa (poliglucano β -1:4) en el armazón principal de la pared celular, en las algas las microfibrillas de la pared celular a menudo están constituidas por celulosa ⁹⁵. También son frecuentes las paredes celulares constituidas por polímeros de azúcares distintos a la glucosa ⁹⁴. Los azúcares xilosa, manosa y galactosa, por ejemplo, son capaces de formar sistemas fibrilares al polimerizarse, tal como hacen la mayoría de las combinaciones que incluyen a la glucosa. Por ejemplo, ciertas rodofíceas y clorofíceas poseen mananos β -1:4 en sus paredes celulares. Los xilanos son también frecuentes en un buen número de clorofíceas, donde también pueden estar en combinación con pequeñas cantidades de glucanos. Se da por otro lado toda una variedad de

heteropolímeros denominados "hemicelulosas solubles en álcali", menos específicos desde el punto de vista taxonómico, que pueden contener distintos azúcares, tales como glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, etc. ⁹⁴.

Entre los polisacáridos estructurales de las algas de carácter ácido, se encuentran el ácido algínico, el agar y el carragenano, todos de gran importancia económica (ver Introducción). El ácido algínico es el polisacárido más abundante en las feofíceas, y está constituido por los ácidos D-manurónico y L-gulurónico ⁹³. El agar y el carragenano son típicos de las rodofíceas, siendo los polisacáridos más abundantes en ellas. Estos son polisacáridos sulfatados consistentes en unidades de galactosa o de moléculas de galactosa modificadas. Estas últimas incluyen 3,6-anhidro-L-galactosa y 6-O-metil-D-galactosa. Las proporciones y la localización de los grupos sulfatos y de las galactosas modificadas varían en los polisacáridos de los distintos géneros. La principal diferencia entre agar y carragenano es que el primero contiene unidades de D- y L-galactosa, mientras que el segundo consiste enteramente en unidades de D-galactosa.

Las cianobacterias tienen un tipo de pared celular muy parecido al encontrado en las bacterias gram-negativas, con una capa interna de peptidoglucano y una capa externa de lipopolisacárido ⁹⁶. Los azúcares glucosamina y ácido murámico son constituyentes de la capa de peptidoglucano, habiéndose encontrado en algunas ocasiones galactosamina y manosamina. Los azúcares constituyentes de los lipopolisacáridos de la capa externa incluyen azúcares neutros (glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa, etc.), O-metil-derivados de los mismos (por ejemplo, 2-O-metil-xilosa, 2-O-metil-manosa, 2-O-metil-fucosa, etc.) y ácidos urónicos (glucurónico, galacturónico), además de aminoazúcares.

V.1.3. Papel de los hidratos de carbono en la dieta humana.

Los distintos hidratos de carbono absorbibles que forman parte de la biomasa algal suponen un aporte energético como alimento. No obstante, la presencia de hidratos de carbono en la dieta no es necesaria para el hombre, demostrándose experimentalmente que se puede sobrevivir en estado de buena salud durante meses con una dieta de carne y grasas ⁹⁷. Todas las unidades de azúcar necesarias para la síntesis de importantes moléculas del cuerpo como ácidos nucleicos o ácido hialurónico, o para la actividad de tejidos tan esenciales como el nervioso o el muscular, pueden sintetizarse a partir de precursores como aminoácidos, lactato, piruvato y glicerol.

Sin embargo, la presencia de hidratos de carbono en la dieta es de importancia dado que su metabolismo permite desviar el contenido en proteínas de la dieta hacia el "pool" de aminoácidos del organismo. De otra forma, las proteínas serían utilizadas como fuente de energía, dando lugar a la formación de urea, cuya eliminación se realiza a través de un proceso costoso. A la hora de considerar la biomasa algal como una fuente de proteína de buena calidad, especialmente la de las microalgas, el contenido en hidratos de carbono es por tanto relevante, ya que contribuye al aprovechamiento dietético adecuado de esa proteína.

Al considerar la digestibilidad de los hidratos de carbono presentes en las algas, es necesario distinguir las diferentes clases dentro de ellos, ya que unos son más digestibles que otros. Por lo tanto, un determinado porcentaje total de hidratos de carbono no implica que todo está disponible como alimento. Por ejemplo, los pentosanos son más fácilmente solubles, por lo que pueden considerarse como más digestibles ³. Asimismo, la presencia de polisacáridos de difícil digestión en la pared celular puede afectar a la absorción de otros principios inmediatos contenidos en la biomasa algal, como pueden ser las proteínas. En el presente

capítulo se describe el análisis de los azúcares neutros de los productos, con el propósito de caracterizar de forma general esta proporción de la biomasa algal. Aunque el método utilizado no permite determinar ácidos urónicos, los perfiles de azúcares obtenidos pueden proporcionar una visión general de la composición en hidratos de carbono de los productos, que permite discutir su contribución al valor nutricional de los mismos, bajo la perspectiva de los abundantes estudios publicados sobre la composición de los polisacáridos de las algas.

V.2. Resultados.

En la Tabla 11 aparece el contenido en azúcares neutros de los productos estudiados. Con la excepción del producto "Dulce", el azúcar mayoritario fué la glucosa. Los cromatogramas representativos de esta fracción se muestran en la Figura 7. En la Figura 8 aparecen los espectros de masas correspondientes a los acetatos de alditol de los azúcares identificados.

V.2.1. "Wakame".

Los azúcares neutros más abundantes en este producto fueron glucosa, fucosa y galactosa. El bajo contenido total en azúcares neutros (9.41 g/100g) con respecto a la proporción de hidratos de carbono totales (39.2 g/100g - Tabla 1) se debe a la gran proporción de ácidos urónicos (30-40 g/100 g), en forma de ácido algínico, en Undaria pinnatifida ²².

La mayor proporción de glucosa y fucosa puede deberse a la presencia de celulosa y de fucanos, comunes en esta feofita, que pueden constituir 2.5-3% y 2-3% del esporófito, respectivamente ²². No obstante, la presencia de fucanos también puede contribuir al contenido en otros azúcares neutros, además de la fucosa, tales como galactosa, manosa y

Tabla 11. Contenido en azúcares neutros de los productos estudiados (g/100 g peso seco).

Azúcares	<u>Undaria</u> <u>pinnatifida</u>	<u>Hijikia</u> <u>fusiforme</u>	<u>Palmaria</u> <u>palmata</u>	<u>Fucus</u> <u>sp.</u>	<u>Chlorella</u> <u>pyrenoidosa</u>	<u>Spirulina</u> <u>sp.</u>	<u>Spirulina</u> <u>platensis</u>	<u>Spirulina</u> <u>maxima</u>
1. Eritrosa	-	-	-	-	-	0.28	0.05	0.31
2. Ramnosa	-	-	-	0.08	0.63	0.33	0.57	0.85
3. Fucosa	1.30	1.83	-	2.86	0.04	-	0.10	tr.
4. Ribosa	0.17	-	0.20	0.05	0.25	0.43	0.57	0.77
5. Arabinosa	0.08	0.13	0.51	0.03	0.22	-	0.05	tr.
6. Xilosa	0.13	0.21	28.82	0.50	0.07	0.24	0.20	0.13
7. Manosa	0.62	1.12	0.24	0.31	0.15	0.29	0.26	0.30
8. Galactosa	1.00	1.48	1.54	0.58	1.78	1.10	1.11	2.29
9. Glucosa	6.11	14.69	6.11	5.97	2.65	7.78	6.94	6.84
10. X	-	-	2.91	-	-	-	-	-

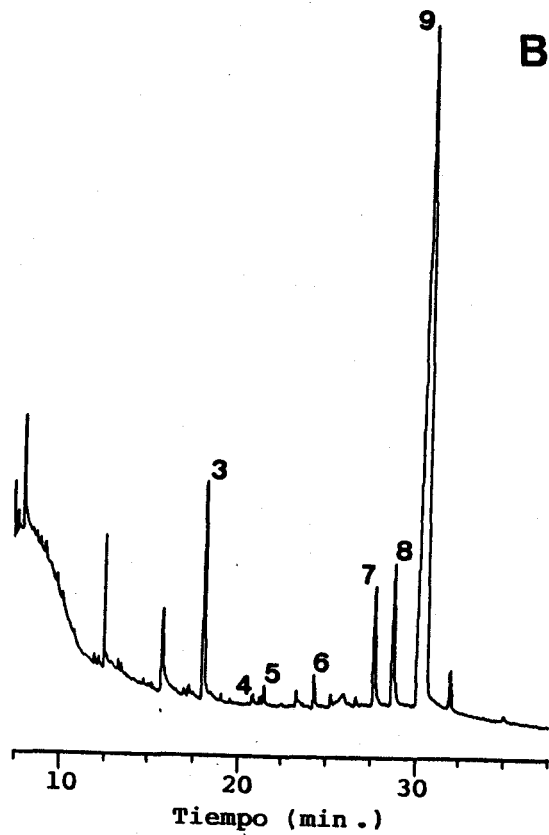
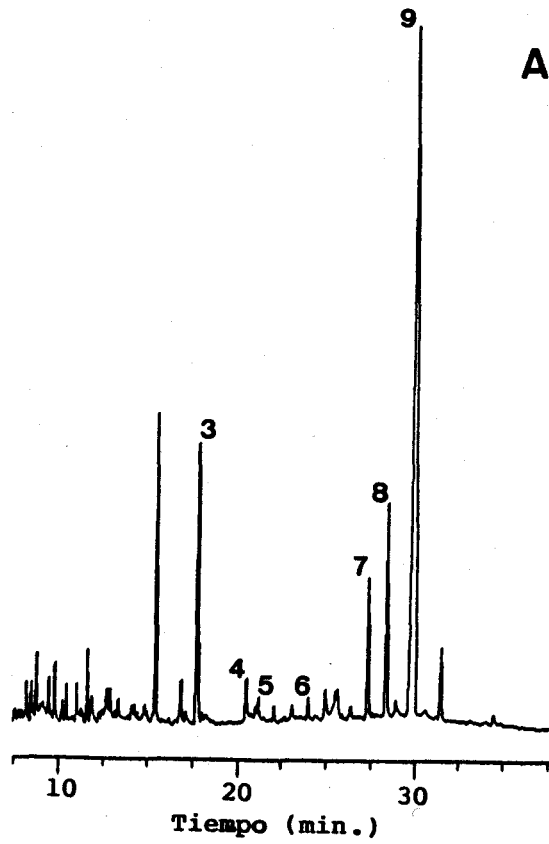


Figura 7. Cromatogramas representativos de la fracción de azúcares neutros de los productos, analizados como acetatos de alditol. La identificación de los picos se refiere a la Tabla 11. A: "Wakame"; B: "Hijiki".

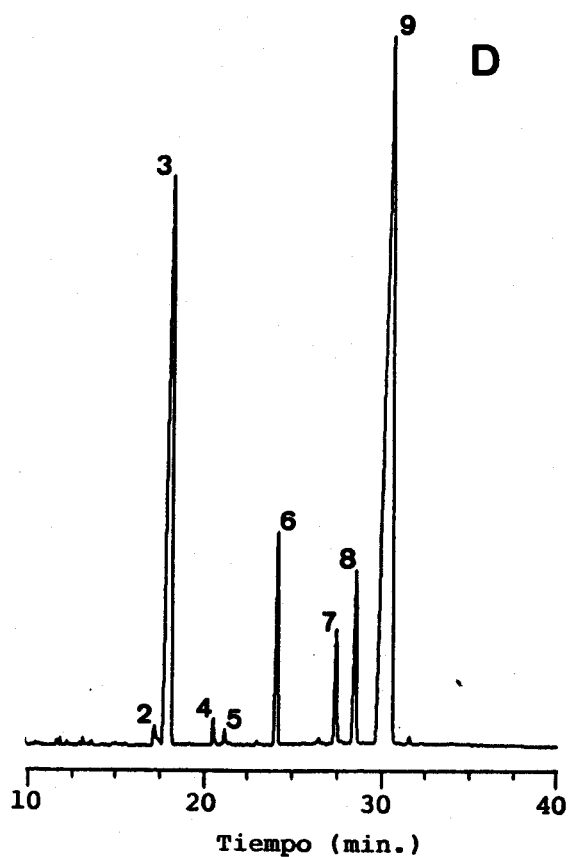
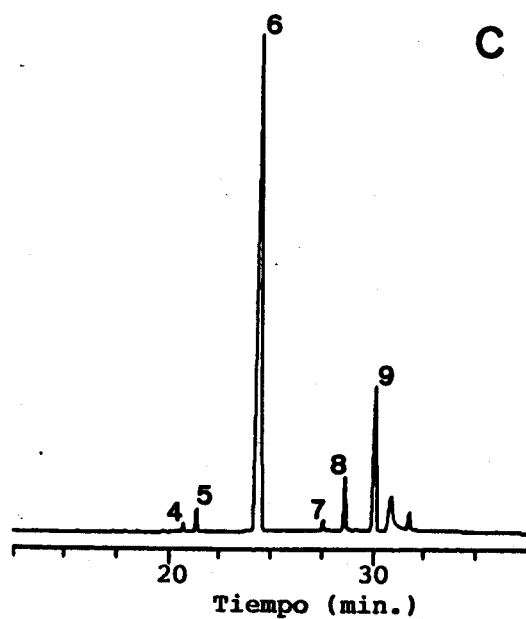


Figura 7 (Cont.). Cromatogramas representativos de la fracción de azúcares neutros de los productos, analizados como acetatos de alditol. La identificación de los picos se refiere a la Tabla 11. C: "Dulce"; D: "Fucus".

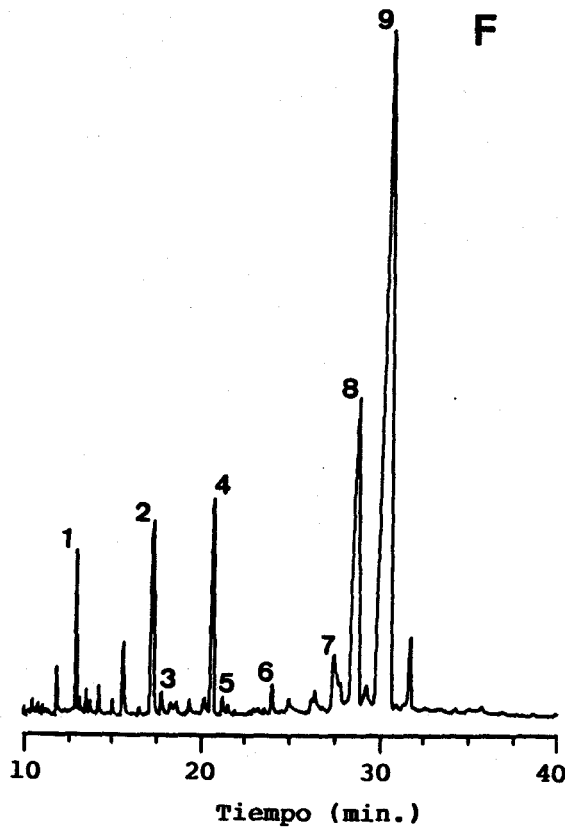
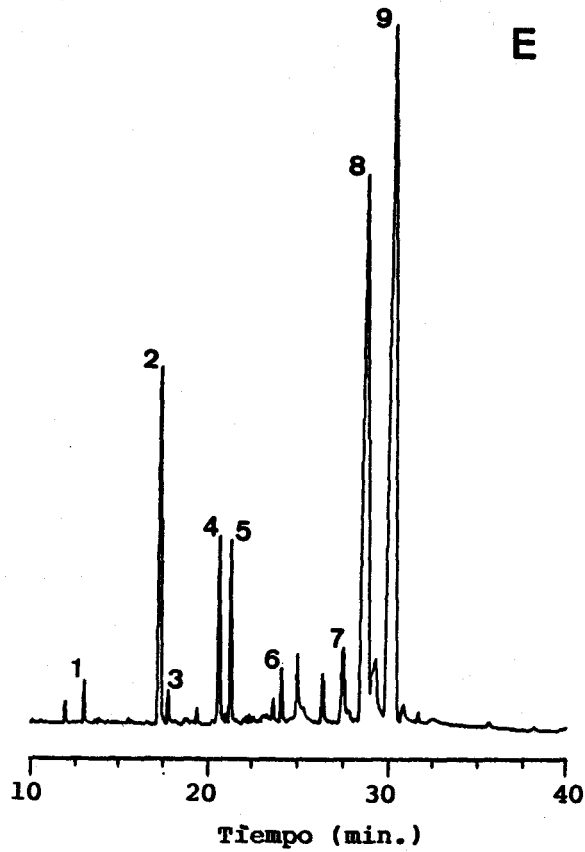


Figura 7 (Cont.). Cromatogramas representativos de la fracción de azúcares neutros de los productos, analizados como acetatos de alditol. La identificación de los picos se refiere a la Tabla 11. E: "Chlorella"; F: "Spirulina" (S. maxima).

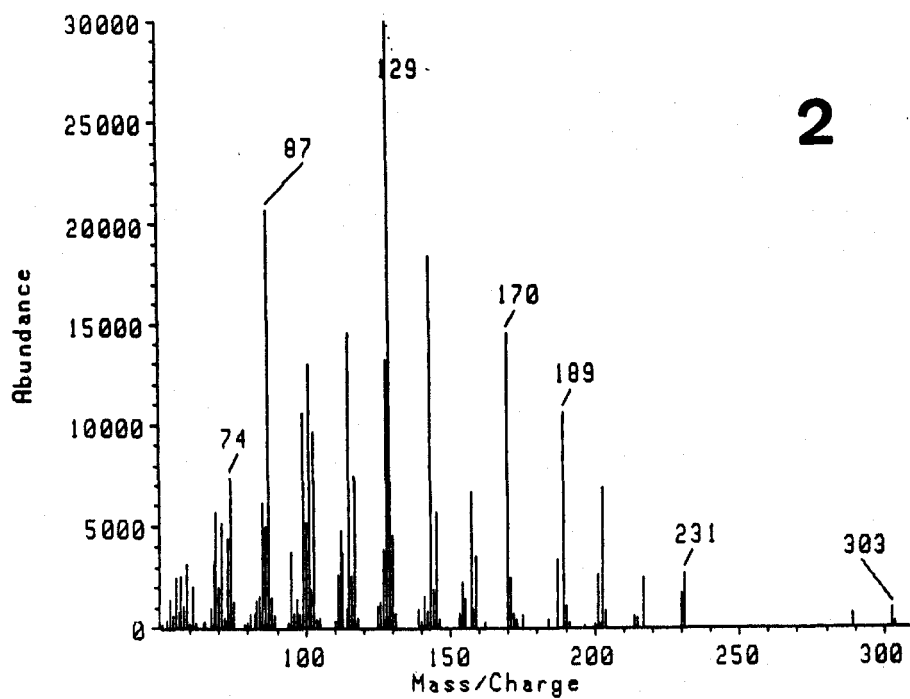
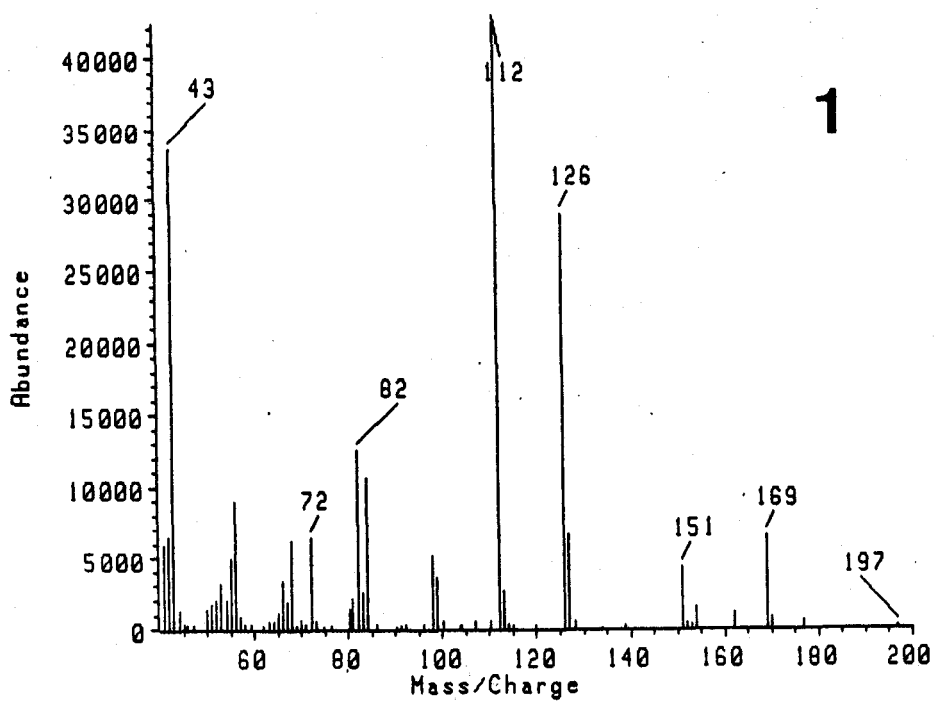


Figura 8. Espectros de masas de los acetatos de alditol correspondientes a los azúcares neutros analizados. La numeración se refiere a la Tabla 11. 1: Eritrosa; 2: Ramnosa.

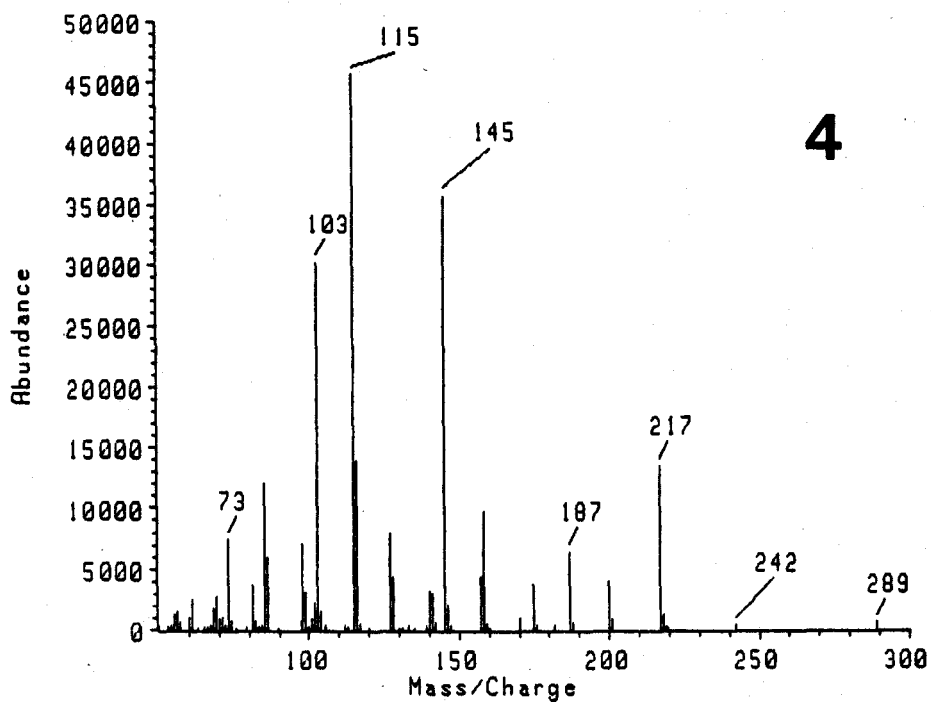
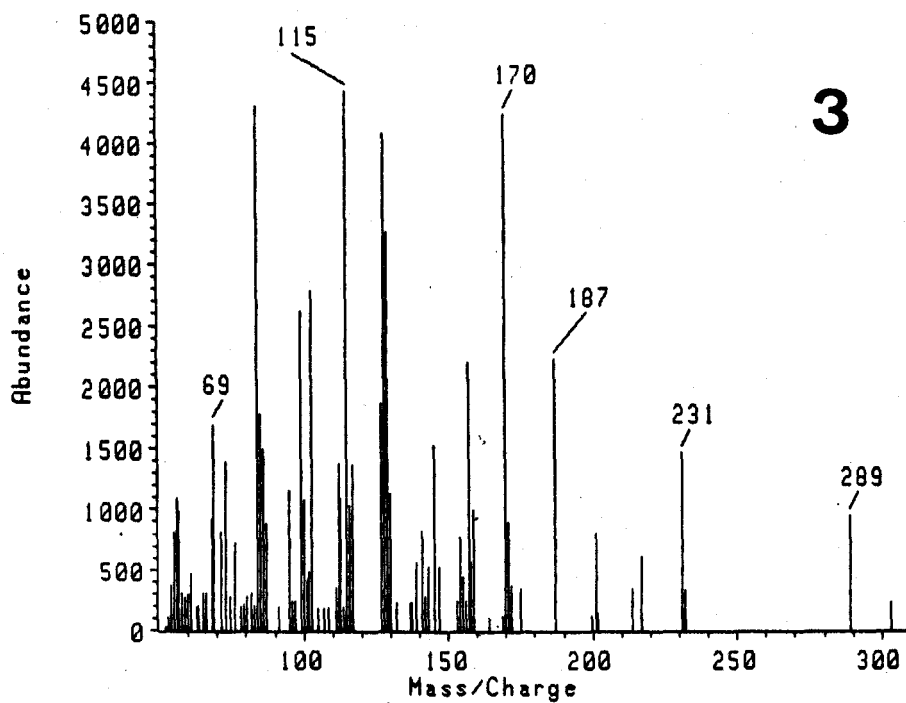


Figura 8 (Cont.). Espectros de masas de los acetatos de alditol correspondientes a los azúcares neutros analizados. La numeración se refiere a la Tabla 11. 3: Fucosa; 4: Ribosa.

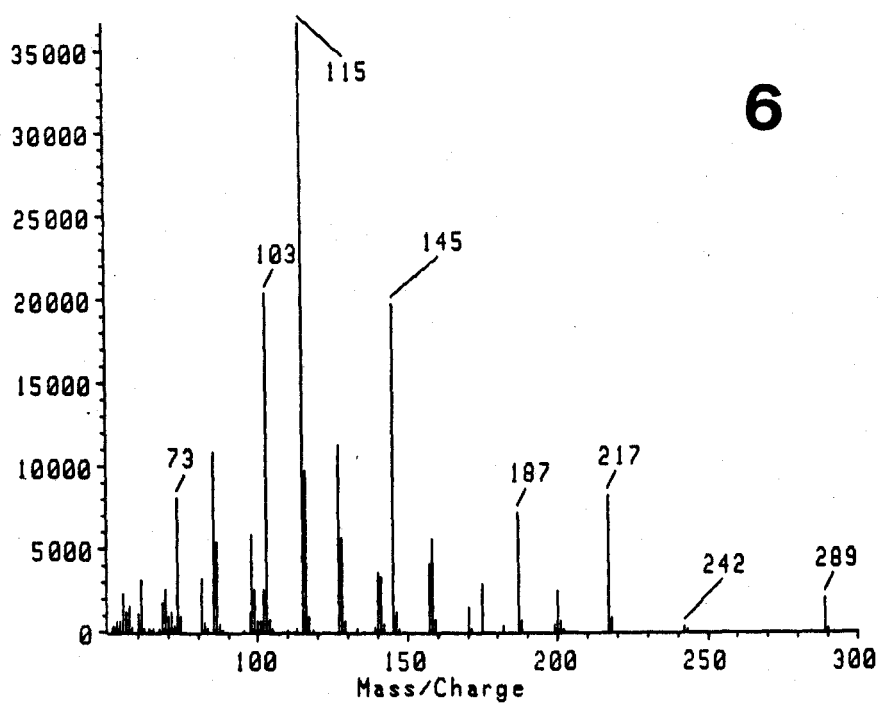
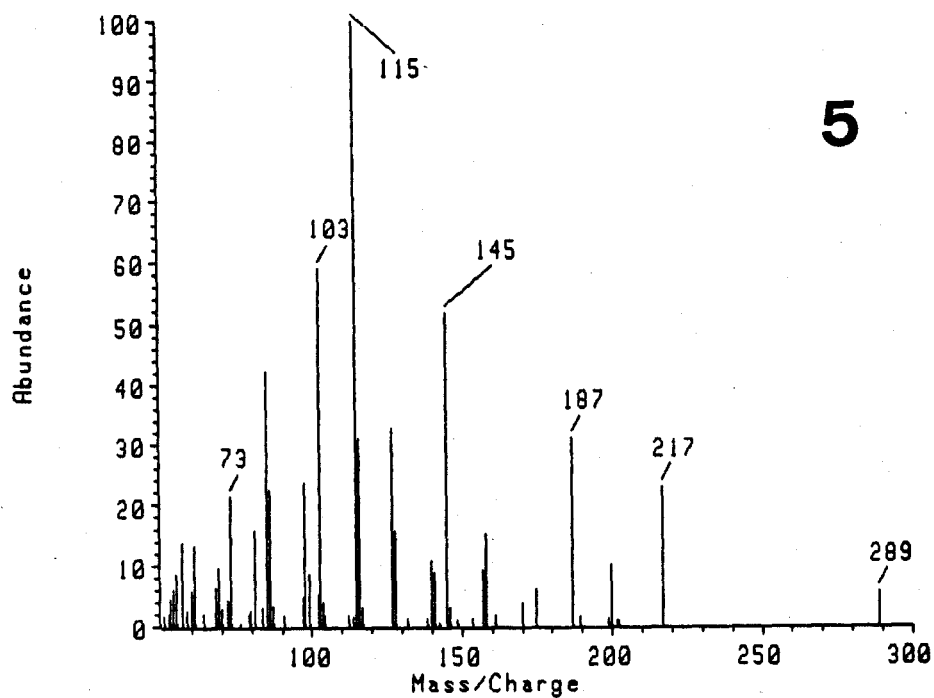


Figura 8 (Cont.). Espectros de masas de los acetatos de alditol correspondientes a los azúcares neutros analizados. La numeración se refiere a la Tabla 11. 5: Arabinosa; 6: Xilosa.

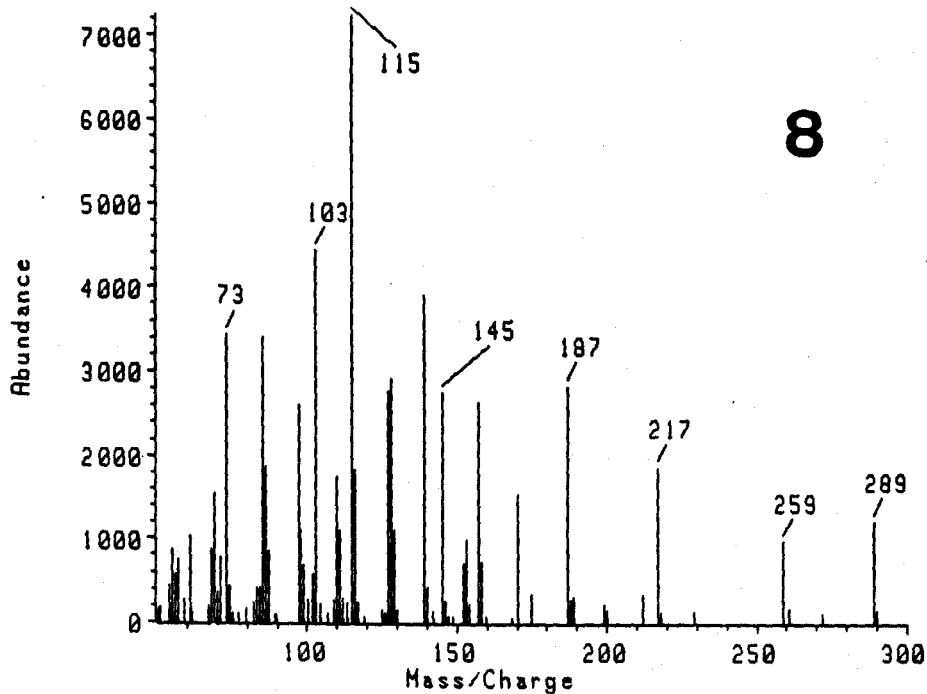
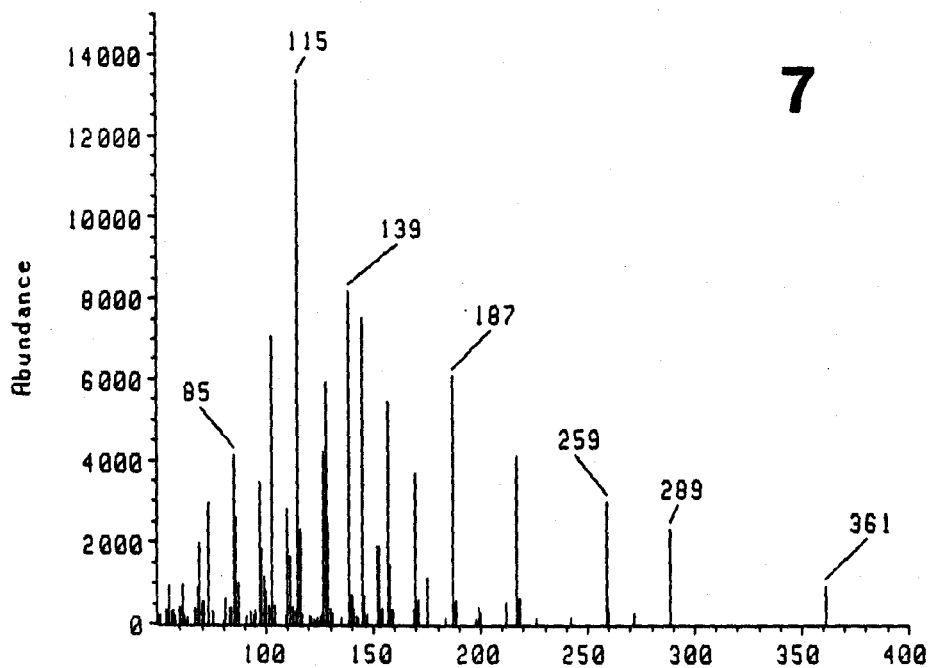


Figura 8 (Cont.). Espectros de masas de los acetatos de alditol correspondientes a los azúcares neutros analizados. La numeración se refiere a la Tabla 11. 7: Manosa; 8: Galactosa.

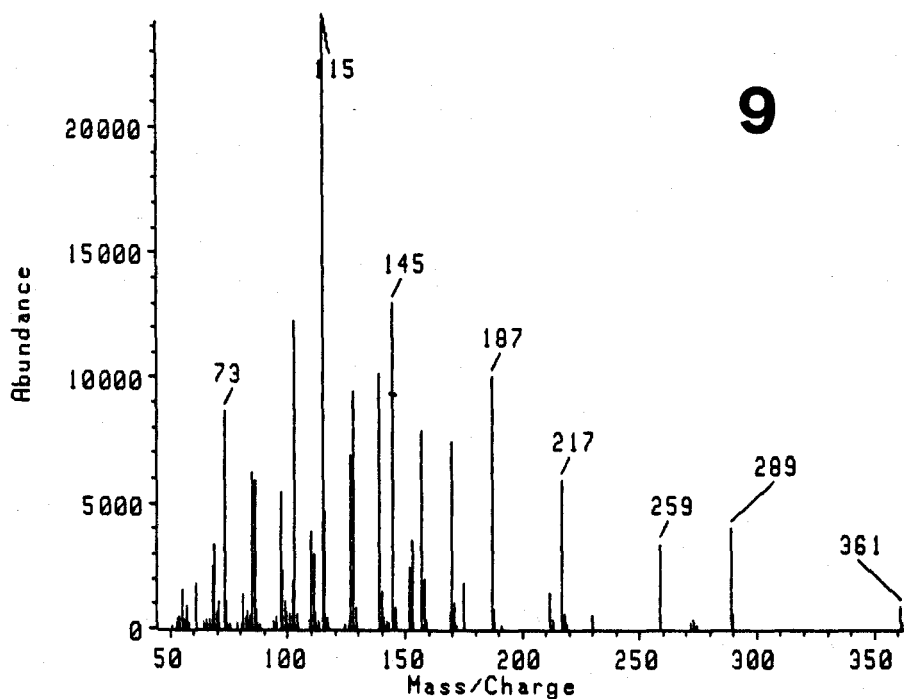


Figura 8 (Cont.). Espectros de masas de los acetatos de alditol correspondientes a los azúcares neutros analizados. La numeración se refiere a la Tabla 11. 9: Glucosa.

xilosa ⁹³. U. pinnatifida también contiene el poliglucano laminarano (0.6%) ⁷, posiblemente presente en el producto, contribuyendo, por tanto, al contenido en glucosa en el mismo.

V.2.2. "Hijiki".

El mayor contenido en glucosa de los productos estudiados se dió en el producto de Hijikia fusiforme. El contenido total de azúcares neutros (19.46 g/100g) difiere en forma notable del de hidratos de carbono totales (52.7 g/100g - Tabla 1), debido probablemente a la presencia de ácidos urónicos. Estos se presentan en H. fusiforme en forma de ácido algínico, que en otra ocasión ⁷ se ha encontrado que constituye el 20.5% del peso seco del alga. El contenido en glucosa del producto (14.69%) es extremadamente alto en comparación al contenido en laminarano encontrado previamente en esta especie (1.0%) ⁷.

V.2.3. "Dulce".

Este producto fué el que presentó mayor contenido en azúcares neutros. A diferencia de los demás productos, el azúcar mayoritario fué xilosa, comprendiendo el 71% del total, seguida por glucosa y un azúcar no identificado (X). Este azúcar, con una proporción de casi el 3%, podría corresponder probablemente a 2-Q-glicerol- α -D-galacto-piranósido, también llamado floridósido. Este hidrato de carbono de bajo peso molecular es un producto de reserva común en las rodofitas. En Palmaria palmata suele constituir menos de un 10% en peso seco, aunque puede llegar hasta un 25% ¹⁰.

V.2.4. "Fucus".

Glucosa y fucosa fueron los azúcares más abundantes en este producto. En la información que se proveía al consumidor se indicaba la presencia de almidón, por lo que al menos una

parte de la glucosa detectada (5.97 g/100g) corresponde a ese aditivo. Las especies de este género pueden contener también cierta proporción de laminarano (0.7-10.2%) ^{24,25,98,99}. El ácido algínico también se presenta en las especies de Fucus, en donde puede constituir de un 2.6 a un 29.4% ^{24,25,98-100}.

El contenido en fucosa de este producto fué el mayor de los estudiados. Las fucaceas contienen una alta proporción de un polisacárido sulfatado, que puede suponer hasta un 20% del peso seco ⁷. Este polisacárido, denominado fucano, es un polímero heterogéneo, que en Fucus vesiculosus y otras algas marrones está constituido por unidades de L-fucosa-4-sulfato, unidas por enlaces 1:2, y en algunas ocasiones por enlaces 1:3 y 1:4, además de pequeñas proporciones de otros azúcares neutros (como galactosa y xilosa) y de ácidos urónicos ⁷. La presencia de este polisacárido en el producto puede explicar su alto contenido en fucosa.

V.2.5. "Chlorella".

Los azúcares mayoritarios en este producto fueron glucosa y galactosa. Estos azúcares forman una gran parte de los polisacáridos hemicelulósicos descritos en Chlorella pyrenoidosa ¹⁰¹. Esta especie contiene tres tipos principales de polisacáridos: hemicelulosa A, hemicelulosa B y almidón, en proporción 9:2:1, respectivamente. Las hemicelulosas contienen distintas proporciones de galactosa, glucosa, manosa, arabinosa, xilosa y ramnosa. La hemicelulosa A tiene galactosa como azúcar más abundante (33.9%), mientras que la hemicelulosa B tiene mayor proporción de glucosa (33.7%) y un azúcar no identificado (27%). El almidón de C. pyrenoidosa está constituido por amilosa y amilopectina, en analogía al almidón de las plantas superiores ¹⁰¹. Por tanto, el perfil de azúcares obtenido para este producto se corresponde con los resultados publicados para la composición de polisacáridos de esta especie.

V.2.6. "Spirulina".

Los tres productos elaborados con Spirulina presentaron patrones similares en la composición de azúcares neutros, siendo en todos ellos glucosa y galactosa los azúcares mayoritarios. La proporción de glucosa de los productos es similar a la publicada por Shekharam et al. ¹⁰² para S. platensis (8.05%). En cambio, el contenido en ramnosa es inferior (3.30%), y superior el de galactosa (0.38%). Asimismo, el contenido en ramnosa publicado para S. maxima (9%) ⁷¹ es muy superior al observado en estos productos.

V.3. Discusión.

Los productos analizados presentaron en general un perfil de azúcares neutros en concordancia con los resultados publicados en la literatura para la composición de hidratos de carbono en las especies correspondientes.

El alto contenido en xilosa del producto "Dulce" se corresponde con lo observado en la literatura en Palmaria palmata. En esta especie el principal polisacárido es un xilano compuesto por unidades de D-xilosa unidas por enlaces β -1:3 y β -1:4, y carentes de grupos ésteres sulfato o metoxilo ¹⁰. Esto es una excepción en las rodofíceas, donde los polisacáridos más abundantes suelen ser poligalactanos sulfatados como agar y carragenano. El xilano presente en P. palmata es además diferente al de las plantas terrestres, que tiene enlaces β -1:4 exclusivamente, y al de las algas verdes, que posee sólo enlaces β -1:3.

La alta proporción de glucosa de "Dulce" (6.11 g/100 g) puede deberse al polisacárido de reserva llamado almidón de florídeas, típico de la rodofíceas, y constituido por cadenas de unidades de glucosa unidas por enlaces α -1:4 y α -1:6, y ocasionalmente por enlaces α -1:3. Este polisacárido se ha

descrito previamente en P. palmata ¹⁰, aunque por otra parte Percival ⁹³ ha señalado la falta de evidencias para poder afirmar su presencia en esta especie. P. palmata también sintetiza pequeñas cantidades de una celulosa modificada, con iguales cantidades de xilosa y glucosa unidas por enlaces β -1:4. Este polisacárido no constituye más de 3.5% en peso seco ¹⁰, por lo que no puede ser exclusivamente la fuente de glucosa en el producto analizado. No se han descrito en esta especie otros polisacáridos con glucosa, por lo que parece probable la presencia de almidón de florídeas en el producto.

La alta proporción de pentosanos, fácilmente absorbibles, y de almidón en "Dulce" sugieren que el contenido en hidratos de carbono de este producto puede ser en gran parte absorbido por el organismo. Ya en 1914 se tuvieron datos de la utilización en un 100%, medida como desaparición en el tracto digestivo, de los polisacáridos de P. palmata por el hombre, a diferencia de otras algas, como Gracilaria coronopifolia (30%), Hypnea nidifica (10%) y Ahnfeltia concinna (60%) ³. En efecto, la ptialina, la diastasa y otros enzimas digestivos puede hidrolizar los enlaces que unen las unidades de α -glucosa del almidón de florídeas y del floridósido ¹⁰³. Asimismo, los enlaces β -1:3 y β -1:4 del xilano de P. palmata, resistentes a los enzimas digestivos del hombre, pueden ser degradados por los microorganismos de su tracto digestivo, aunque se desconoce hasta qué punto este material hidrolizado supone una fuente efectiva de hidratos de carbono absorbibles ¹⁰.

Unos de los principales problemas que plantea el uso de las algas como alimento es la difícil digestibilidad de los polisacáridos de sus paredes celulares. Este hecho dificulta la utilización de las proteínas, factor especialmente importante en el caso de las microalgas. La absorción de los polisacáridos puede aumentar después de un periodo de acondicionamiento al consumo de algas, tal y como pasa en experimentos con animales ³. No obstante, en determinados casos es necesario un tratamiento de la biomasa para aumentar

su digestibilidad. De los distintos métodos de procesamiento estudiados, el tratamiento en tambor de secado parece ser el más efectivo con las microalgas ¹⁰⁴.

Dada la distinta naturaleza de la pared celular de Spirulina, su biomasa es en este sentido más fácilmente accesible para el organismo. Se ha aislado un glucano de la pared celular de S. platensis, que constituye el 1% de la biomasa, constituido por unidades de glucosa unidas por enlaces β -1:2 ¹⁰⁵. Aunque los enzimas digestivos del hombre no son capaces de degradar este tipo de enlaces, la baja proporción de este polisacárido en la biomasa algal total no hace suponer que constituya un problema con respecto a su digestibilidad. Según Quillet ¹⁰⁶, el principal polisacárido de S. platensis es un ramnano, que constituye el 10% de su biomasa. No obstante, Shekharam et al. ¹⁰² observaron que la ramnosa sólo comprendía un 22.3% de los azúcares totales, aunque era el segundo azúcar más abundante, después de la glucosa. La presencia de este polisacárido no ha sido confirmada posteriormente por Casu et al. ¹⁰⁷, quienes estudiaron los polisacáridos de reserva en esta especie, y aislaron y caracterizaron un glucano con todas las características del glucógeno. Este polisacárido era el principal constituyente de los hidratos de carbono y constituía más del 15% de la biomasa. Estos autores atribuyeron la discrepancia con los resultados de Quillet al uso de una estirpe diferente en los experimentos. Los resultados de Santillan ⁷¹ para S. maxima también son contradictorios, dado el alto valor para la ramnosa (9%) y el bajo contenido en glucógeno (0.5%). No obstante, el glucógeno es un material de reserva común en cianobacterias, siendo sintetizado en los periodos de luz y usado como fuente de carbono y energía en la oscuridad ¹⁰⁸. Además, no ha sido descrito en cianobacterias ningún polisacárido de reserva distinto al glucógeno. Nuestros resultados muestran la predominancia de glucosa en el contenido de azúcares totales, en concordancia a lo publicado por Casu et al. ¹⁰⁷. La predominancia en Spirulina de un polisacárido fácilmente

degradable en el tracto digestivo humano indica que, en este sentido, la biomasa es bastante accesible al organismo.

VI. LIPIDOS: ACIDOS GRASOS E HIDROCARBUROS ALIFATICOS.

VI.1. Introducción.

Los lípidos de las algas son típicamente ésteres de glicerol y de ácidos grasos de 12 a 24 átomos de carbono ¹⁰⁹. La composición relativa de ácidos grasos varía según los distintos grupos de algas ¹¹⁰⁻¹¹⁶. En general, las clorofíceas presentan elevadas concentraciones de los ácidos grasos de 18 átomos de carbono, las feofíceas de 16, 18 y 20, las rodofíceas de 20, y las cianobacterias de 16 y 18. Las cianobacterias filamentosas tienden a contener gran cantidad de ácidos poliinsaturados (35 a 60% del total), a diferencia de las unicelulares, que carecen prácticamente de ellos. Los ácidos poliinsaturados de 20 carbonos son frecuentes en feofíceas y rodofíceas, y los de 18 carbonos en clorofíceas.

Aunque la fuente última de carbono para la síntesis de ácidos grasos es el dióxido de carbono fijado en la fotosíntesis, se considera al acetil-CoA como inmediato precursor, a partir del cual se forman los ácidos grasos saturados ¹¹⁷. La mayoría de los ácidos insaturados se sintetizan en las algas mediante sucesivas desaturaciones de ácidos análogos más saturados (Fig. 9) ¹¹⁸. Por ejemplo, el ácido γ -linolénico (18:3-6,9,12) se sintetiza a partir del ácido linoleico (18:2-9,12), y es a su vez precursor del ácido araquidónico (20:4-5,8,11,14) (Figuran entre paréntesis, por este orden: número de átomos de carbono, número de dobles enlaces, y posición de dobles enlaces).

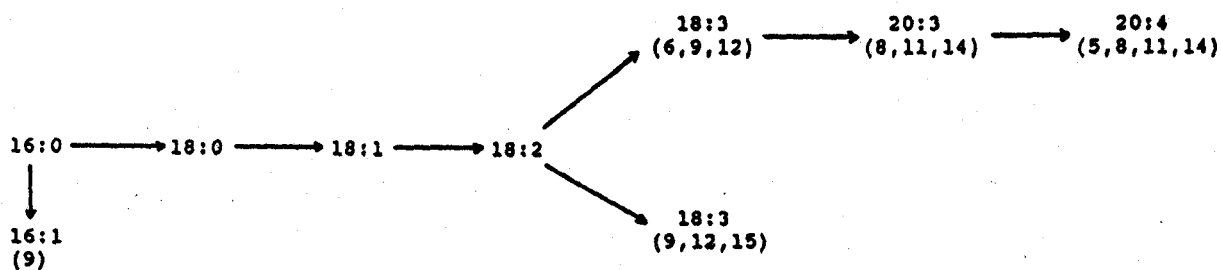


Figura 9. Ruta de síntesis de los ácidos grasos en algas ¹¹⁸.

Diversos factores ambientales pueden afectar las proporciones relativas de ácidos grasos, así como la cantidad total. Por ejemplo, la escasez de nitrógeno en el medio influye en la composición de ácidos grasos en clorofíceas ¹¹⁹⁻¹²¹, euglenofíceas ¹²², feofíceas ^{121,123} y rodofíceas ^{123,124}, induciendo un aumento en la producción de lípidos y una disminución en la proporción relativa de ácidos grasos insaturados. En cambio, no parece tener ningún efecto en cianobacterias, quizás debido a su condición de procariontas ^{119,125}. La luz ^{122,126-128} y la temperatura ¹²⁹⁻¹³³ son otros factores ambientales que influyen en la composición de ácidos grasos en las algas, favoreciendo en general la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados el aumento de luz y las bajas temperaturas. Por lo tanto, el grado de insaturación de los ácidos grasos no es constante, sino que depende de las condiciones externas. Los cambios fisicoquímicos que se dan en cultivos estancos a lo largo del tiempo pueden inducir en las algas la acumulación de lípidos y/o el cambio de la proporción relativa de ácidos grasos ^{119,125,133,134}.

Aunque los ácidos grasos poliinsaturados de 20 átomos de carbono son componentes principales de las membranas de las macroalgas, su biosíntesis ha sido escasamente estudiada ¹¹⁷. En Enteromorpha linza la temperatura óptima para la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados es 15°C, mientras que ésta se inhibe a 10°C y a 20°C ¹²⁴. En poblaciones naturales de Phycodrys sinuosa, del Mar Báltico, la proporción de ácidos poliinsaturados de 20 átomos de carbono varía a lo largo del año, correspondiéndose con cambios en la temperatura y concentración de nutrientes de las aguas ¹²⁴.

Dentro de los ácidos grasos de las algas, quizás los más importantes desde el punto de vista nutricional sean los ácidos grasos insaturados, y dentro de ellos los ácidos grasos esenciales (AGE). Los AGE no son sintetizados por animales, por lo que deben estar presentes en su dieta. En el hombre, los AGE son ácido linoleico (18:2), ácido γ -linolénico (18:3-

6,9,12), ácido dihomo- γ -linolénico (20:3-8,11,14), y ácido araquidónico (20:4-5,8,11,14) ⁴⁴. Los ácidos grasos poliinsaturados α -linolénico (18:3-3,6,9), octadecatetraenoico (18:4-3,6,9,12) y eicosapentaenoico (20:5-5,8,11,14,17) tienen ciertos efectos farmacológicos y son considerados hoy también esenciales en la dieta ^{44,135}. El ácido linoleico es el ácido graso esencial más abundante en los mamíferos, y también se encuentra en gran proporción en las plantas ¹³⁶, mientras que el ácido α -linolénico es el más abundante en las plantas superiores, pudiendo llegar a constituir hasta un 65% de los ácidos grasos totales de la hoja ¹¹⁷. El resto, sin embargo, ocurre raramente en animales o vegetales.

Los AGE se han relacionado en el hombre con dos importantes funciones fisiológicas. Por un lado, son precursores de las prostaglandinas, derivados oxigenados de 20 átomos de carbono con un anillo ciclopentano ¹³⁷. Las prostaglandinas poseen una gran variedad de importantes actividades biológicas de naturaleza hormonal o reguladora. Estas incluyen, entre otras, vasoconstricción, vasodilatación, disminución de la secreción gástrica de ácido, influencia en el ciclo reproductivo femenino y modificación de las respuestas hipofisarias a las hormonas hipotalámicas ⁸¹. Por otro lado, los AGE disminuyen los niveles de lípidos en plasma (colesterol y triglicéridos). La hiperlipidemia se relaciona frecuentemente con el desarrollo de la arterioesclerosis y la enfermedad coronaria del corazón. Este efecto es particularmente patente con el ácido γ -linolénico, 170 veces más efectivo que el linoleico en bajar el nivel de colesterol en plasma ¹³⁸.

La presencia, por tanto, de AGE en los lípidos de las algas contribuye a su valor alimenticio. En algunos casos, se han descrito niveles elevados de AGE en algas. El ácido γ -linolénico se halla en importante proporción en Ochromonas danica ¹³⁹, Microcystis aeruginosa ¹¹⁹ (aunque su uso como alimento sea cuestionable, ya que es tóxica) y en

especies del género Spirulina ^{119,133,140}. El alga roja Porphyridium cruentum es la fuente natural más rica en ácido araquidónico, conteniendo hasta un 35% del total de ácidos grasos si es cultivada a 25 °C, lo que constituye de 4 al 9% de su peso seco ^{139,141,142}. Incluso las prostaglandinas PGE₂ y PGF₂ se han aislado de la macroalga roja Gracilaria lichenoides ¹⁴³. También las macroalgas rojas Schizymenia dubyi y Chondrus crispus tienen altos porcentajes de los ácidos araquidónico y eicosapentaenoico ¹¹⁴. Chlorella minutissima puede contener hasta 2.6 % en peso seco de ácido eicosapentaenoico ¹⁴⁴, Monodus subterraneus hasta un 11% ¹³⁹, y Porphyra yezoensis un 1.6% ¹⁴⁵. Incluso el producto japonés "hoshinori", elaborado a partir de este último alga, se ha considerado una buena fuente de ácido eicosapentaenoico ¹⁴⁶.

La producción de AGE por microalgas se ha considerado una de las aplicaciones comerciales con más futuro dentro de la biotecnología de estos organismos ¹⁴⁷. Gran parte de los AGE de origen marino, contenidos en carnes y aceites de pescado, son sintetizados en niveles inferiores de la cadena trófica, principalmente el fitoplancton. Sin embargo, todavía existe una gran desventaja en los costosos procesos de producción de microalgas con respecto a los procesos que utilizan el pescado como fuente para la producción de aceites ricos en estos AGE. Incluso la utilización de procesos de cultivo en fermentadores, aún aumentando la productividad de biomasa, tiene, como se verá más adelante, la desventaja de la posible desaparición de determinados ácidos grasos debida a las condiciones de cultivo heterotróficas.

Mientras que existe una abundante bibliografía sobre ácidos grasos, la información sobre hidrocarburos de algas es escasa. Ello se debe a su carácter minoritario dentro de la fracción lipídica. Parte de los estudios sobre hidrocarburos de algas se han realizado en el campo de la Geoquímica Orgánica, principalmente como aportes a los sedimentos de ecosistemas acuáticos ^{148,149}. Por otra parte, el estudio de la fracción insaponificable tiene especial interés debido a las

implicaciones de sus componentes con problemas quimiotaxonómicos, evolutivos y citológicos ¹⁵⁰. Además, el uso de la biomasa algal como fuente de alimentos requiere un profundo conocimiento de todos y cada uno de sus componentes.

En las macroalgas verdes, marrones y rojas el contenido de hidrocarburos oscila entre 0.001 y 0.48% ¹²⁴. Dentro de las microalgas, las clorofíceas pueden tener de 0.03 a 1%, y las cianobacterias, entre 0.05 y 0.6% ¹⁵¹. Las feofíceas suelen presentar n-pentadecano como hidrocarburo mayoritario, y las rodofíceas, clorofíceas y cianobacterias, n-heptadecano ^{124,151}.

VI.2. Resultados.

La composición de ácidos grasos de los productos estudiados aparece en las Tablas 12 y 13. En la Figura 10 se muestran cromatogramas típicos de la fracción de ácidos grasos de los productos. Ejemplos de espectros de masas de los ácidos grasos analizados aparecen en la Figura 11. Los productos elaborados a partir de microalgas contuvieron una mayor proporción de ácidos grasos que los elaborados a partir de macroalgas. Las macroalgas presentaron un patrón más complejo de ácidos grasos que las microalgas, en donde la mayor parte estuvo constituida por ácidos de 16 y 18 átomos de carbono. La relación ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados (PIN/SAT) y el contenido absoluto en ácidos grasos poliinsaturados de los productos aparecen representados en las Figuras 12a y 12b, respectivamente.

Los valores obtenidos para hidrocarburos en los productos estudiados son similares a los de la literatura (Tabla 14). En la Figura 13 aparecen cromatogramas representativos de esta fracción. En la Figura 14 se muestran ejemplos de espectros de masas de hidrocarburos. Los productos elaborados a partir de macroalgas presentaron en general un patrón más complejo de hidrocarburos que los elaborados a partir de microalgas. Los primeros contuvieron en general mayor proporción de

Tabla 12. Composición de ácidos grasos en los productos elaborados a base de macroalgas, junto a ejemplos de análisis encontrados en la literatura. Los valores reflejan porcentajes de ácidos grasos totales obtenidos a partir del análisis cromatográfico.

Ac. grasos	n ^a	Underia	Hiikia	Palmaria	Fucus	Underia	Hiikia	Fucus
		<u>pinnatifida</u>	<u>fusiforme</u>	<u>palmeta</u>	<u>sp.</u>	<u>pinnatifida</u> ^b	<u>Fusiforme</u> ^c	<u>vesiculosus</u> ^d
12:0	1	2.5	0.7	5.1	-	0.6	0.1	0.1
14:0	2	3.4	3.7	19.3	13.5	7.2	5.2	8.8
14:1		-	-	-	-	0.9	-	-
15:0	3	0.4	0.4	0.8	0.2	-	0.5	0.1
16:4		-	-	-	-	-	-	0.7
16:3		-	-	-	-	-	0.5	0.3
16:2	4	-	-	-	-	0.4	-	0.3
16:1	5	1.0	4.3	-	1.0	7.8	5.8	1.2
16:0	6	25.5	31.0	65.8	23.1	27.9	38.0	11.2
18:4		-	-	-	-	6.9	4.8	7.8
18:3	7	-	-	-	-	7.2	9.7	8.3
18:2	8	18.4	-	0.7	-	9.2	4.6	9.1
18:1	9	22.7	26.8	-	48.5	15.8	7.5	17.1
18:0	10	2.7	0.8	3.7	2.0	1.8	0.9	0.2
19:0	11	-	-	0.4	1.0	0.2	-	-
20:5		-	-	-	-	3.4	6.1	15.7
20:4	12 ^e	18.4 ^e	16.1 ^e	-	4.9 ^e	8.6	12.1	13.8
20:2	13	0.5	5.6	-	3.9	-	-	-
20:1	14	-	2.8	-	1.0	-	-	-
20:0	15	0.8	3.1	0.2	0.4	1.8	0.4	0.9
22:1	16	-	4.2	-	-	-	-	-
22:0	17	-	0.7	0.6	-	0.3	-	0.5
24:0	18	-	-	1.1	-	-	-	0.1
PIN/SAT ^f		1.1	0.5	0.0	0.2	0.9	0.8	2.6
Total ^g		0.3	0.4	0.3	1.2	2.4	0.1 ^h	ND ⁱ

^a Números de identificación correspondientes a los cromatogramas (Figura 10).

^b Pohl et al. 152

^c Takagi et al. 153

^d Jamieson y Reid 114

^e Suma de 20:3 y 20:4.

^f Relación ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados.

^g En g/100g peso seco.

^h Referido a peso húmedo.

ⁱ No determinado.

Tabla 13 . Composición de ácidos grasos en los productos elaborados a partir de microalgas, junto a ejemplos de análisis tomados de la literatura. Los valores reflejan porcentajes de ácidos grasos totales obtenidos a partir del análisis cromatográfico.

Ac. grasos	n ^o	<u>Chlorella</u> <u>pyrenoidosa</u>	<u>Spirulina</u> <u>sp.</u>	<u>Spirulina</u> <u>platensis</u>	<u>Spirulina</u> <u>maxima</u>	<u>Chlorella</u> <u>pyrenoidosa</u> ^b	<u>Spirulina</u> <u>maxima</u> ^c	<u>Spirulina</u> <u>platensis</u> ^c
14:0	2	-	-	-	-	1.6	tr.	0.4
15:0	3	-	-	-	-	-	-	-
16:2	4	-	-	-	-	5.8	tr.	0.4
16:1	5	18.7	7.0	7.0	9.3	2.0	3.6	3.4
16:0	6	25.1	56.2	52.4	49.1	21.4	68.1	51.7
18:3	7	-	10.3	5.9	15.8	26.4	6.6	19.3
18:2	8	16.1	17.7	12.6	21.7	18.2	6.3	22.2
18:1	9	25.3	tr.	tr.	tr.	16.7	11.9	0.8
18:0	10	5.6	2.6	21.3	1.0	-	tr.	tr.
PIN/SAT ^d		0.71	0.48	0.25	0.75	2.20	0.19	0.80
Total ^e		1.8	1.1	1.3	1.6	NO ^f	NO ^f	NO ^f

^a Números de identificación correspondientes a los cromatogramas (Figura 10).

^b Schneider et al. 154

^c Materassi et al. 155

^d Relación ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados.

^e En g/100g peso seco.

^f No determinado.

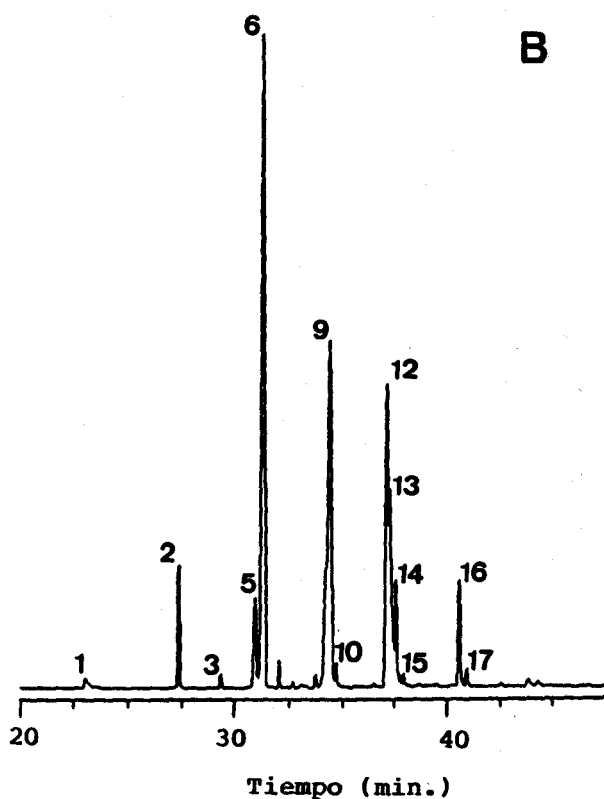
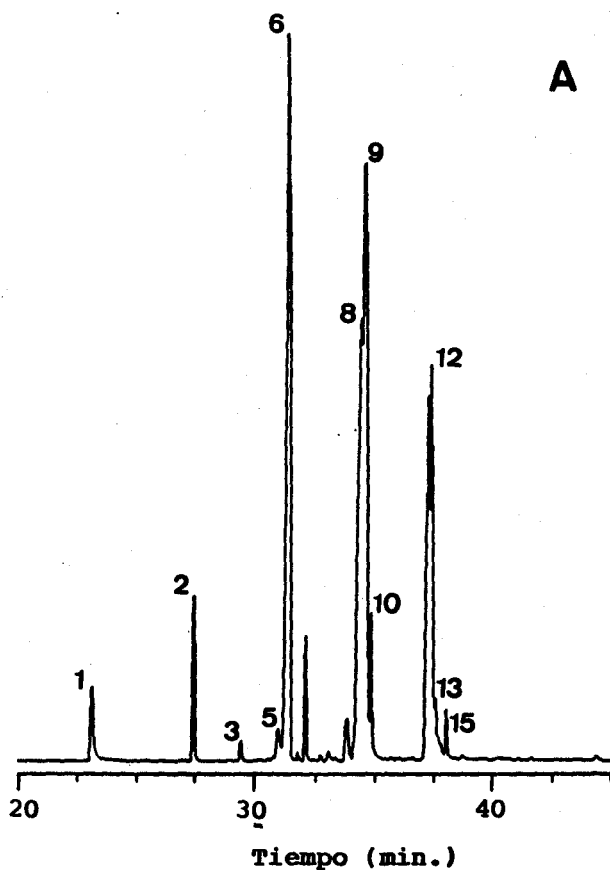


Figura 10. Cromatogramas representativos de la fracción de ácidos grasos de los productos, analizados en forma de ésteres metílicos. La identificación de los picos se refiere a las Tablas 12 y 13. A: "Wakame"; B: "Hijiki".

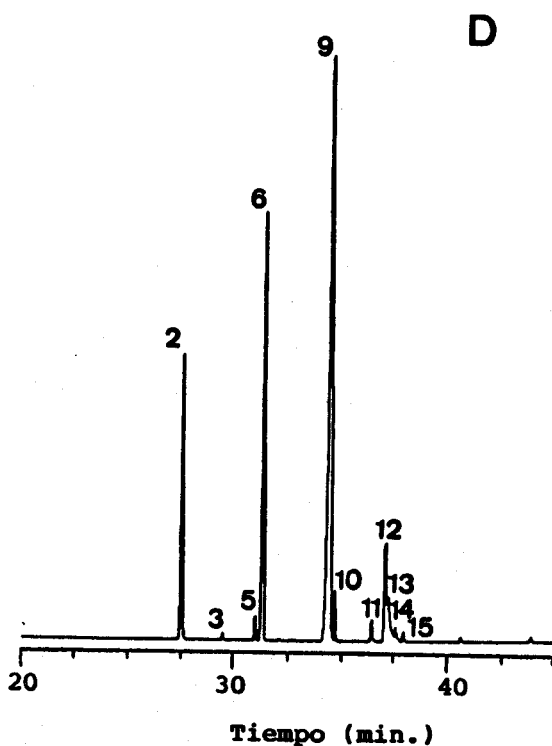
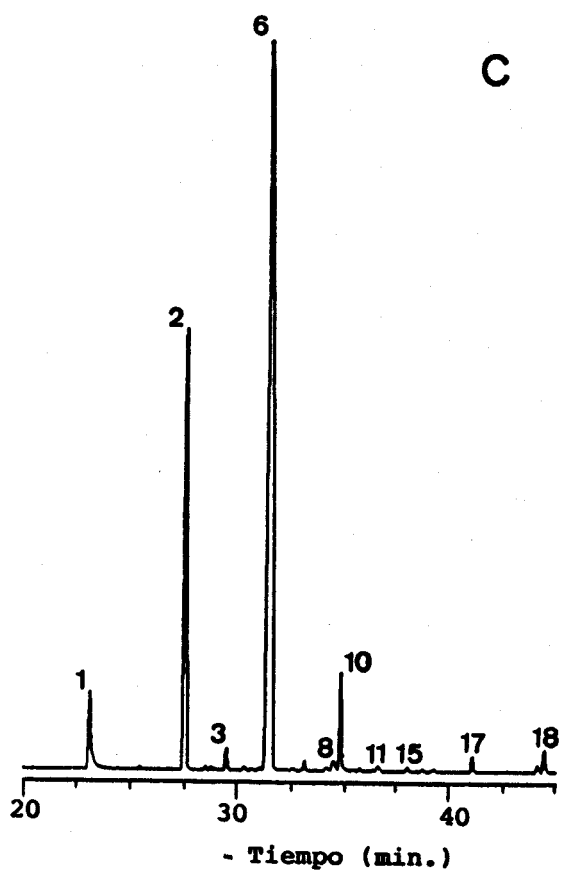


Figura 10 (Cont.). Cromatogramas representativos de la fracción de ácidos grasos de los productos, analizados en forma de ésteres metílicos. La identificación de los picos se refiere a las Tablas 12 y 13. C: "Dulce"; D: "Fucus".

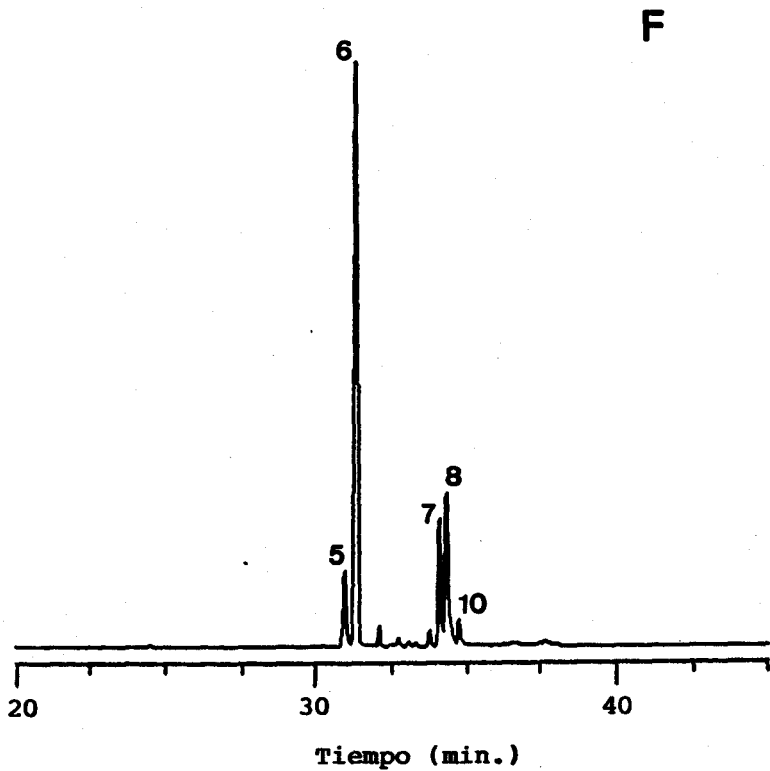
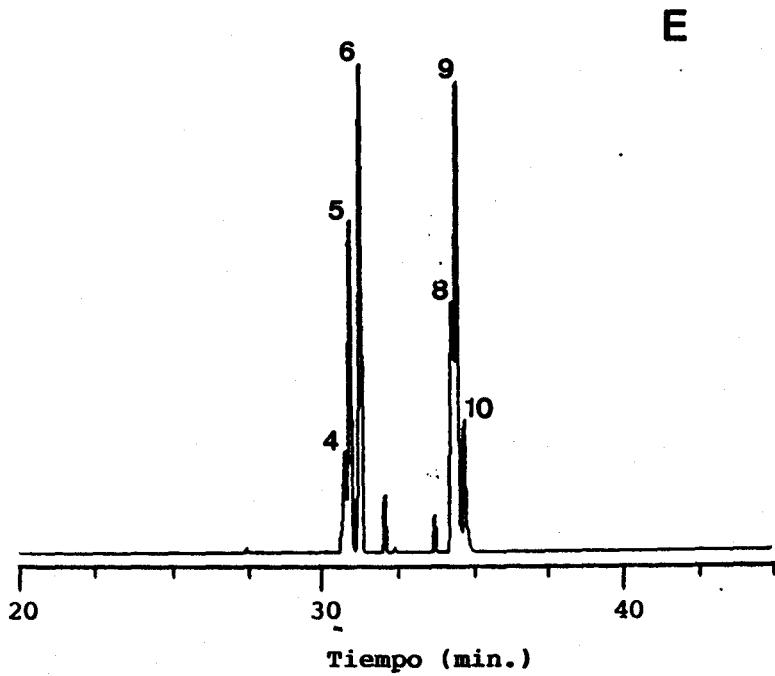


Figura 10 (Cont.). Cromatogramas representativos de la fracción de ácidos grasos de los productos, analizados en forma de ésteres metílicos. La identificación de los picos se refiere a las Tablas 12 y 13. E: "Chlorella"; F: "Spirulina" (*Spirulina* sp.).

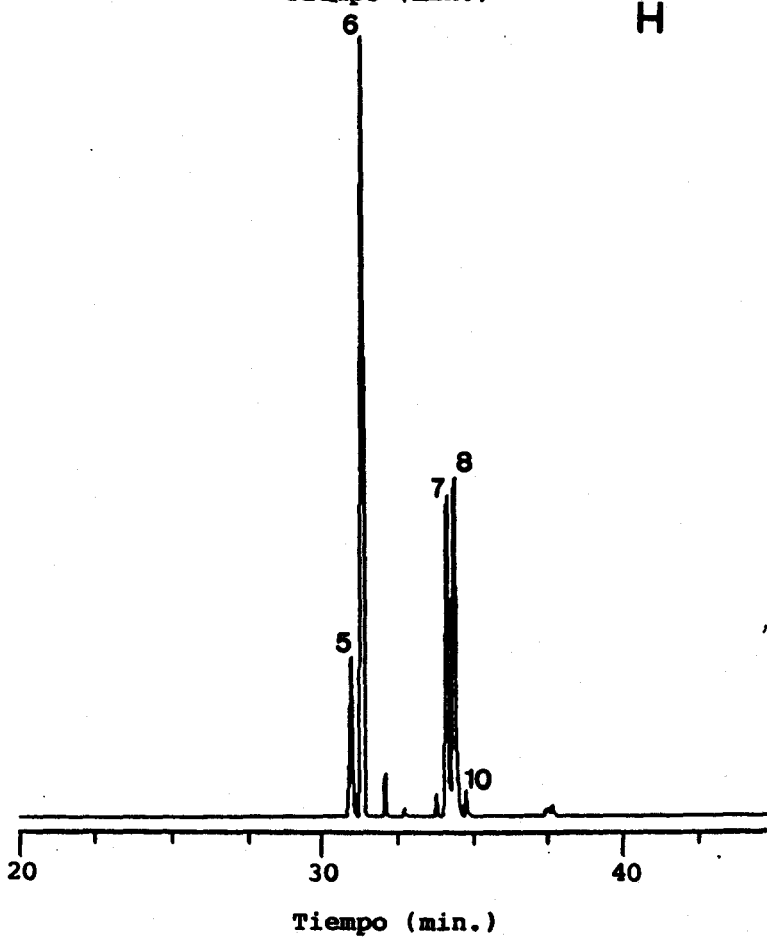
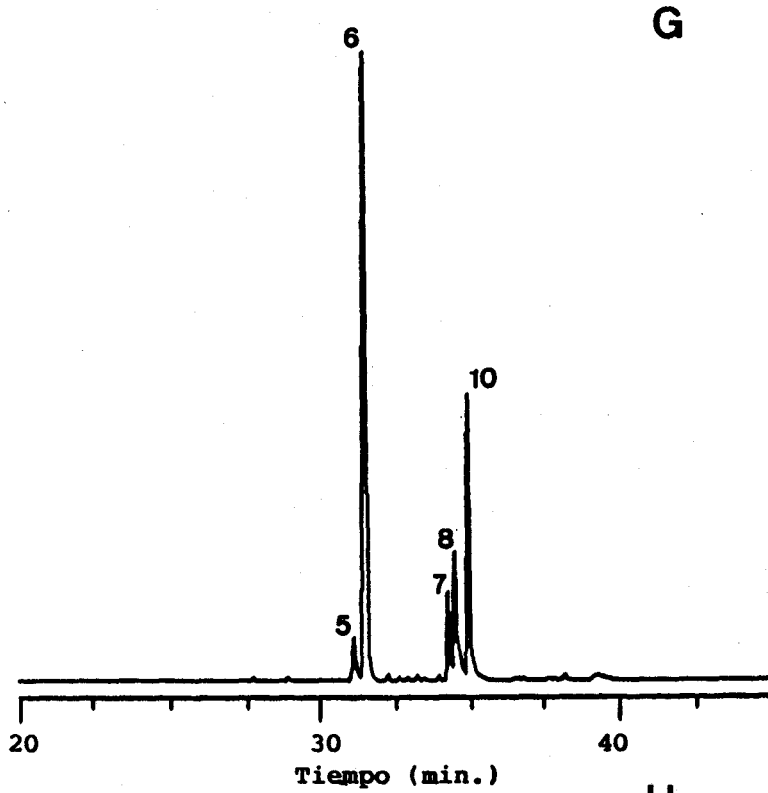


Figura 10 (Cont.). Cromatogramas representativos de la fracción de ácidos grasos de los productos, analizados en forma de ésteres metílicos. La identificación de los picos se refiere a las Tablas 12 y 13. G: "*Spirulina*" (*S. platensis*); H: "*Spirulina*" (*S. maxima*).

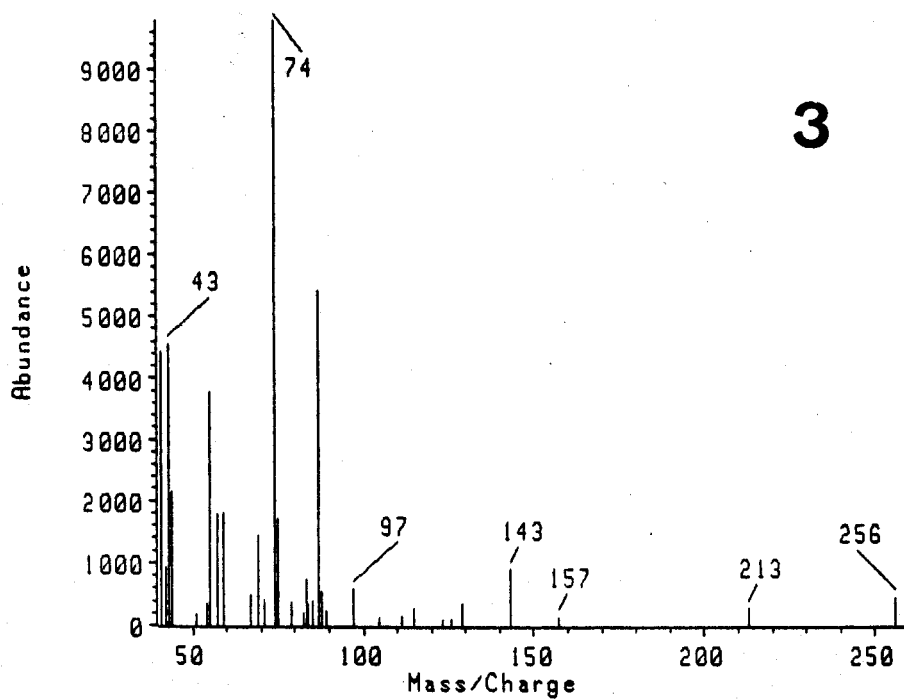
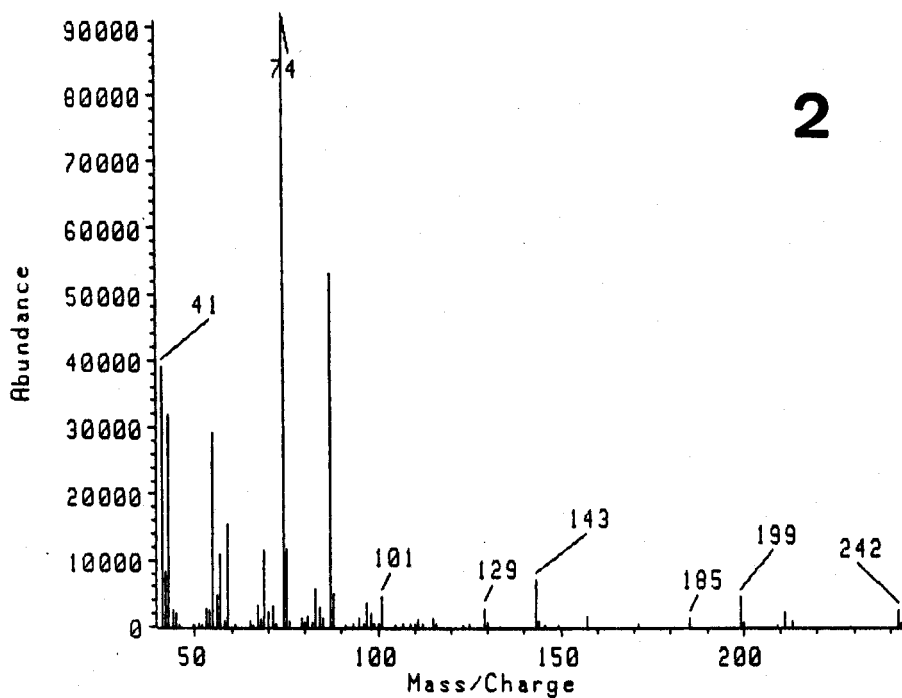


Figura 11. Espectros de masas de los ésteres metílicos de algunos de los ácidos grasos identificados. La numeración se refiere a las Tablas 12 y 13. 2: Acido mirístico (14:0); 3: Acido pentadecanoico (15:0).

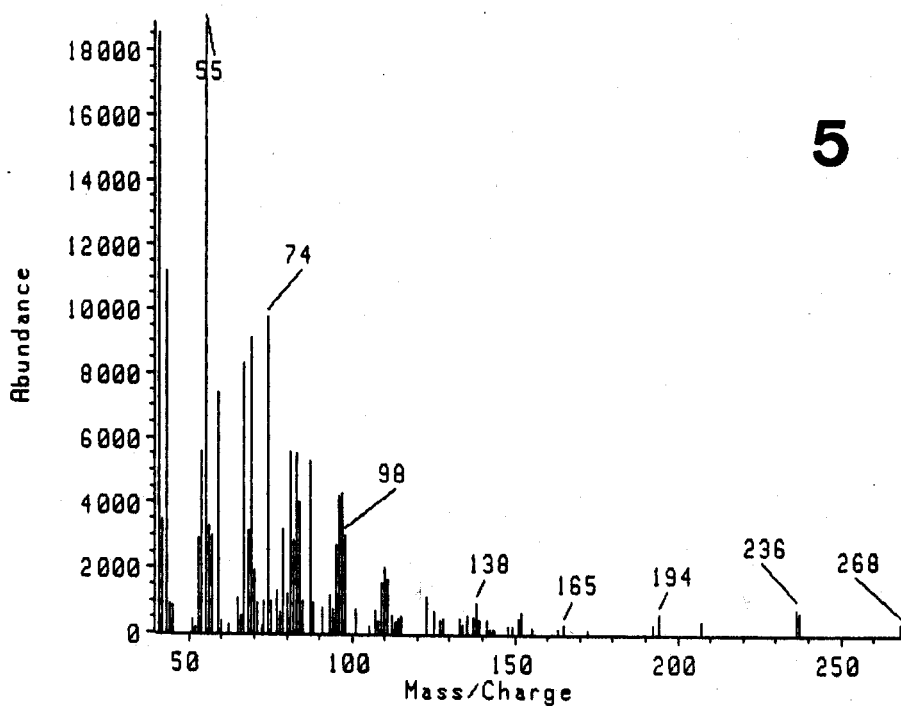
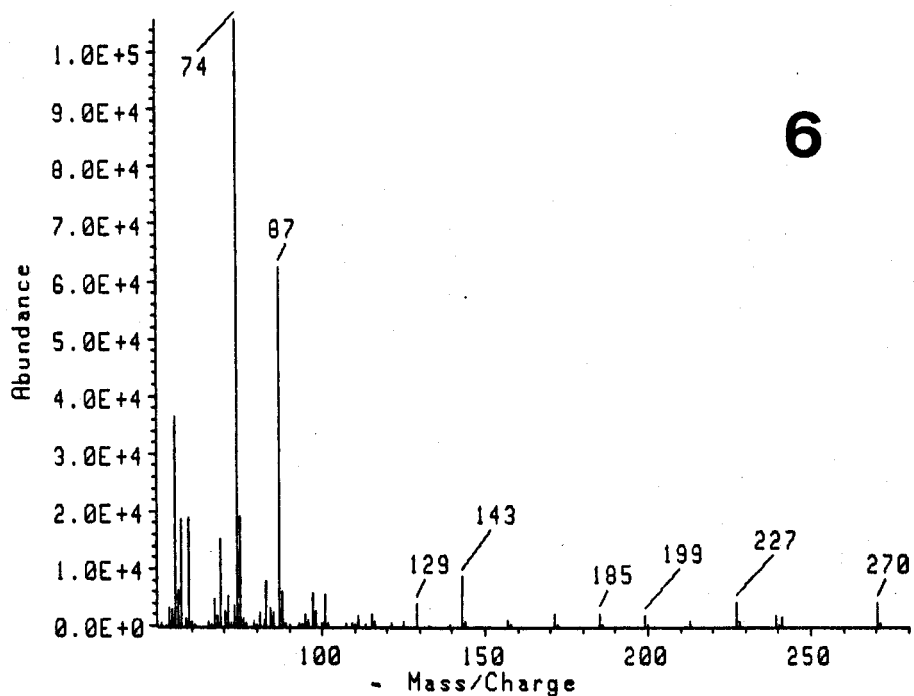


Figura 11 (Cont.). Espectros de masas de los ésteres metílicos de algunos de los ácidos grasos identificados. La numeración se refiere a las Tablas 12 y 13. 6: Acido palmítico (16:0); 5: Acido palmítoleico (16:1).

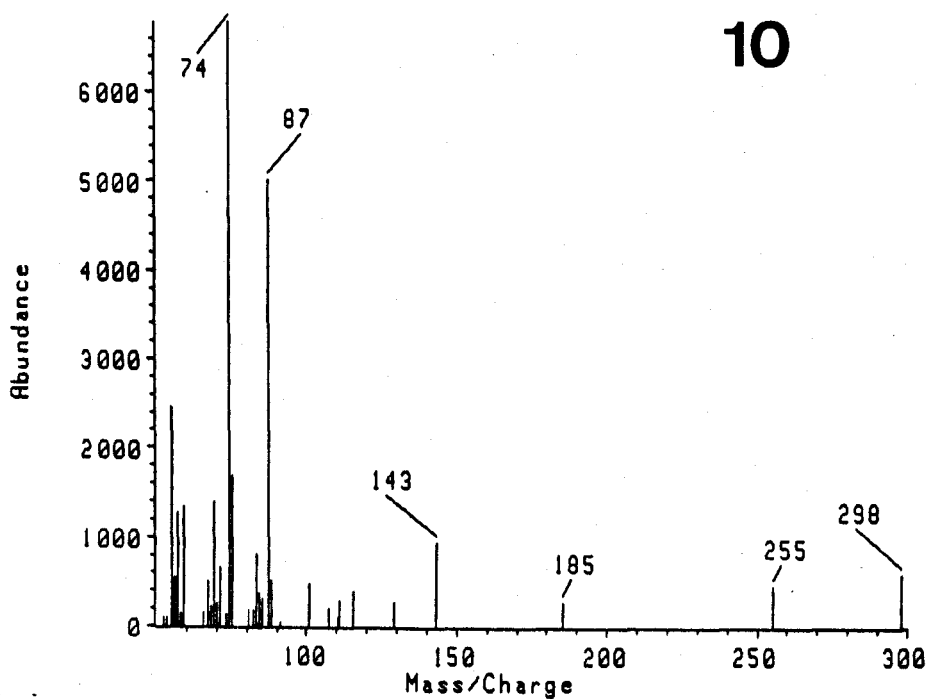
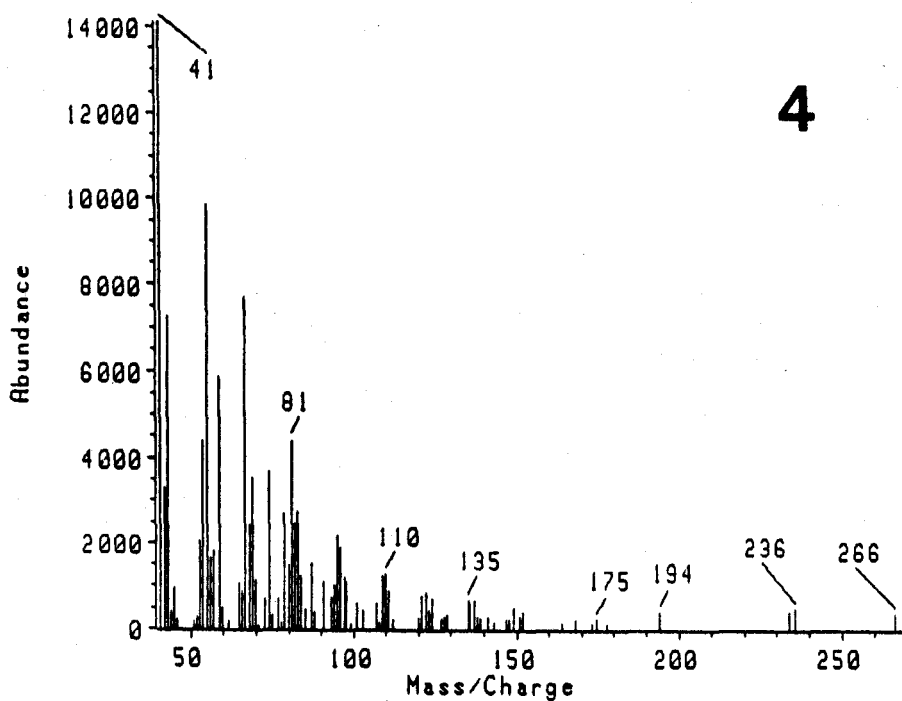


Figura 11 (Cont.). Espectros de masas de los ésteres metílicos de algunos de los ácidos grasos identificados. La numeración se refiere a las Tablas 12 y 13. 4: Acido palmitolénico (16:2); 10: Acido esteárico (18:0).

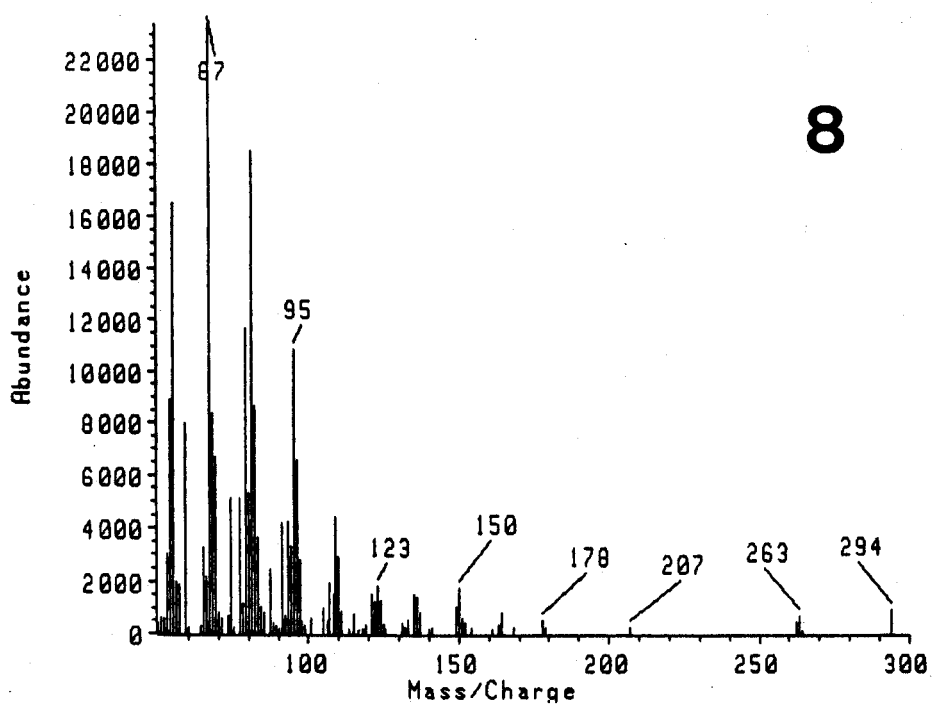
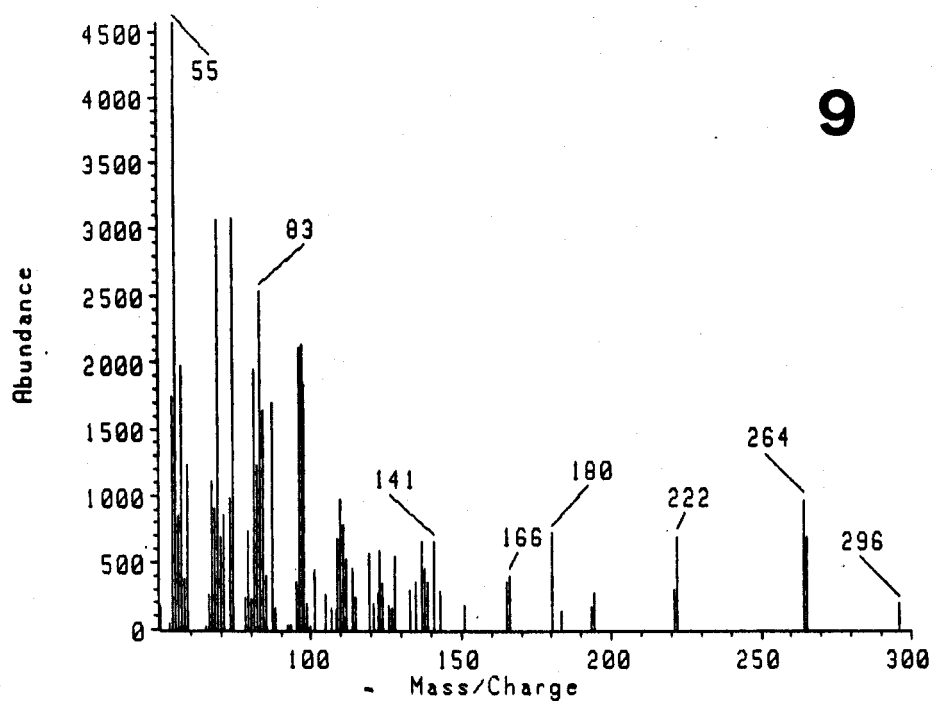


Figura 11 (Cont.). Espectros de masas de los ésteres metílicos de algunos de los ácidos grasos identificados. La numeración se refiere a las Tablas 12 y 13. 9: Acido oleico (18:1); 8: Acido linoleico (18:2).

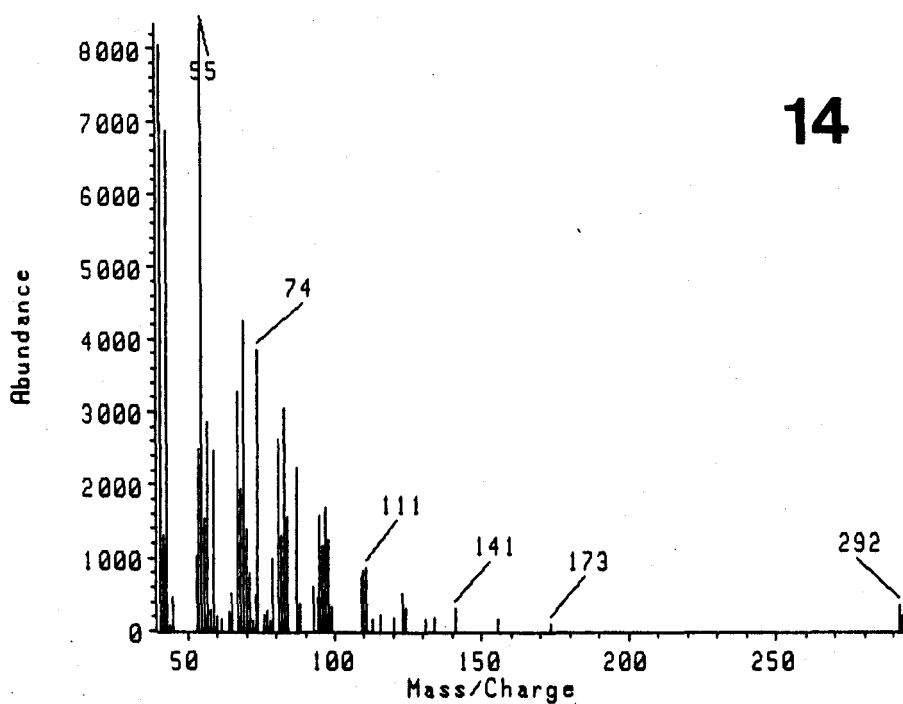
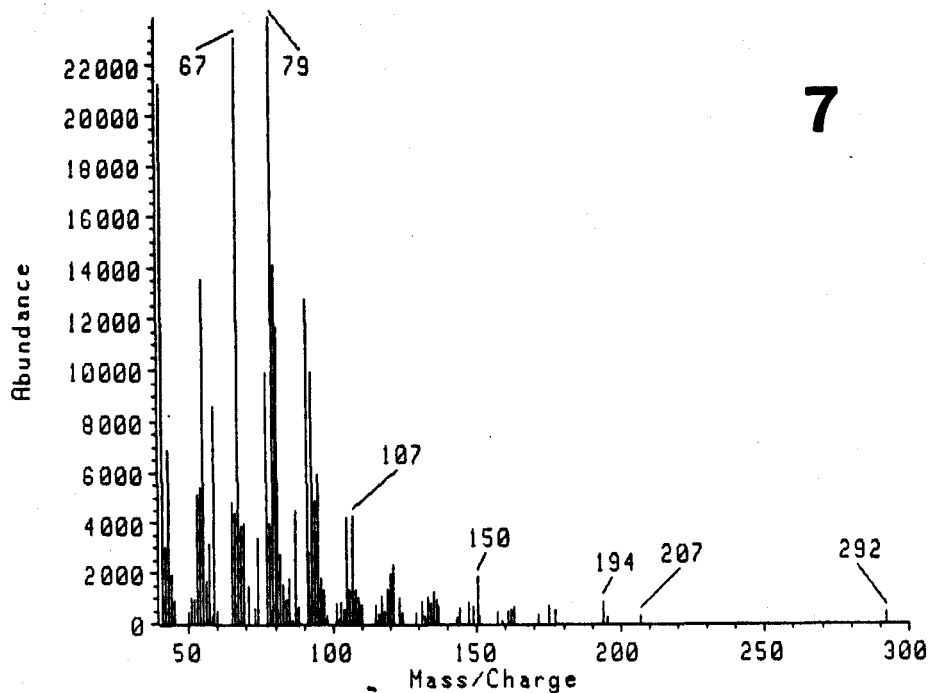


Figura 11 (Cont.). Espectros de masas de los ésteres metílicos de algunos de los ácidos grasos identificados. La numeración se refiere a las Tablas 12 y 13. 7: Acido linolénico (18:3); 14: Acido eicosenoico (20:1).

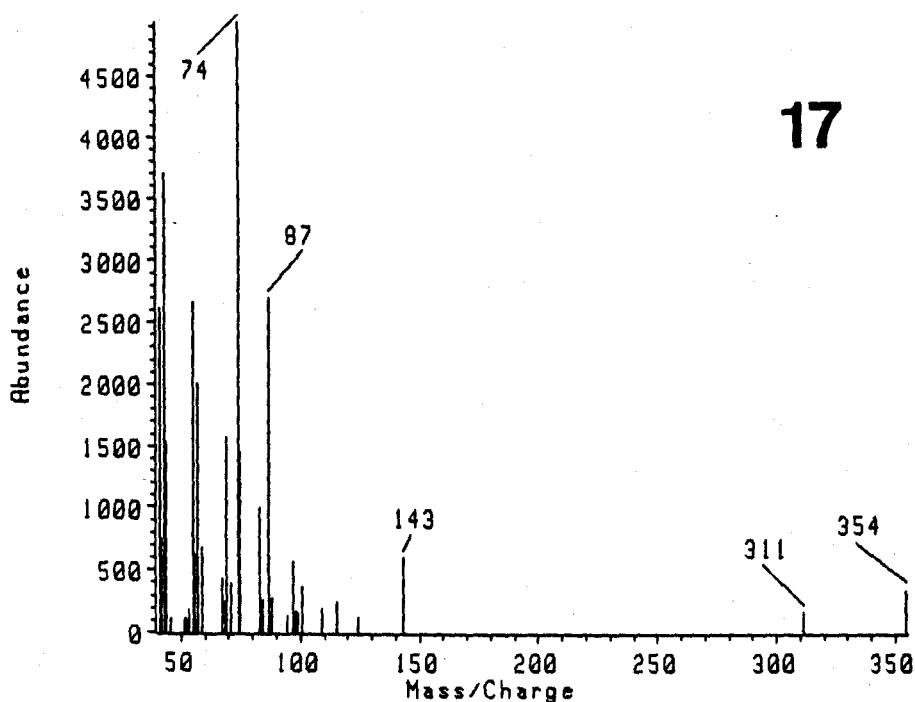
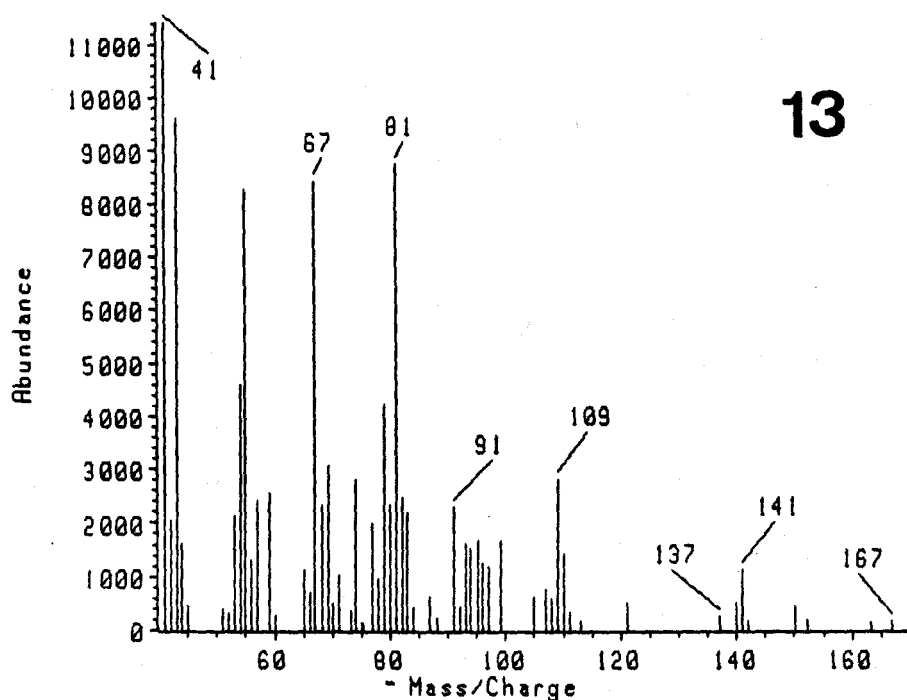


Figura 11 (Cont.). Espectros de masas de los ésteres metílicos de algunos de los ácidos grasos identificados. La numeración se refiere a las Tablas 12 y 13. 13: Acido eicosadienoico (20:2); 17: Acido behénico (22:0).

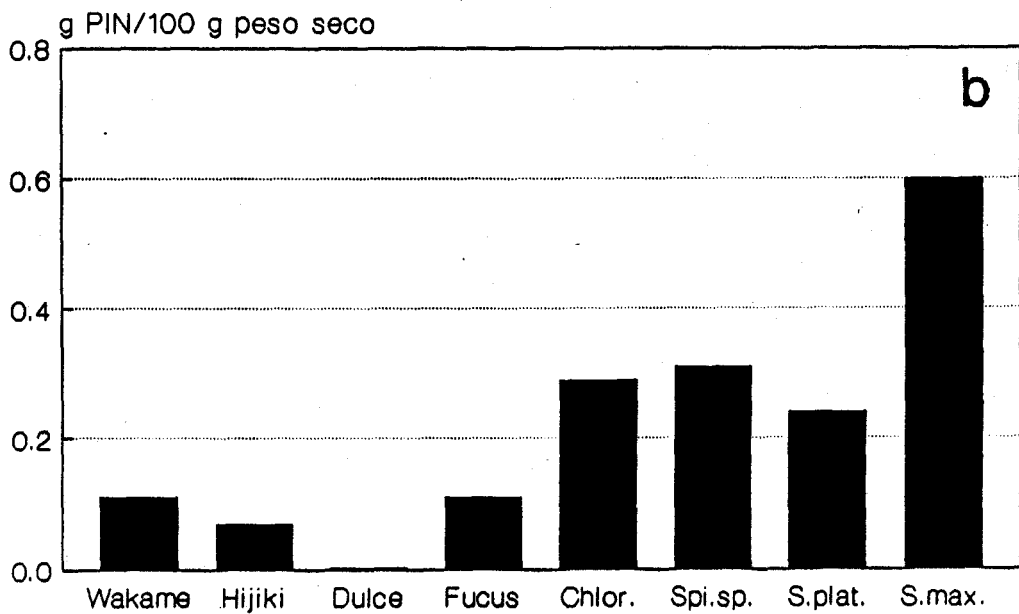
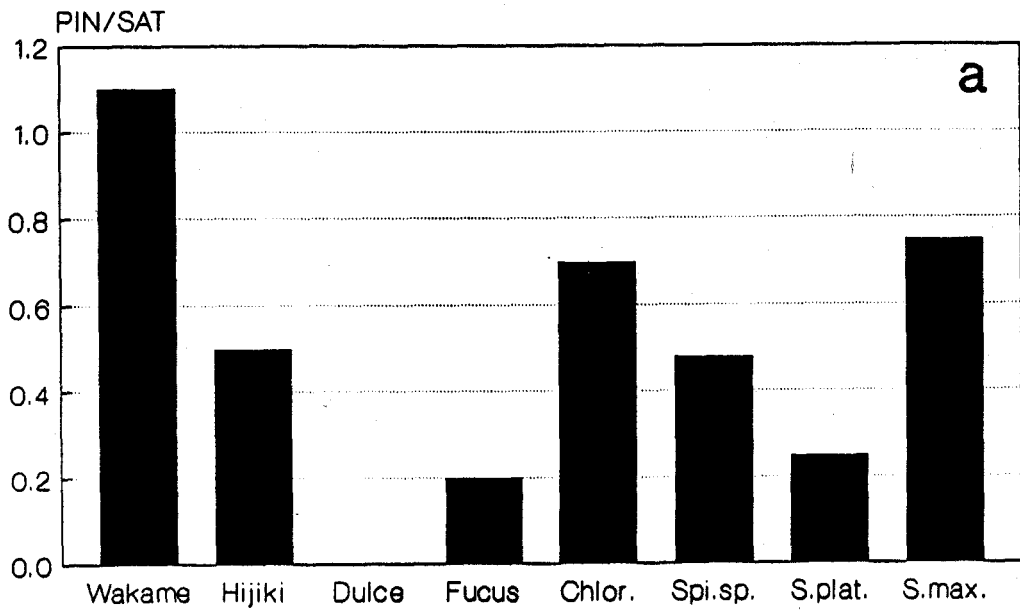


Figura 12. Relación PIN/SAT (Figura 12a) -véase texto- y contenido absoluto en ácidos grasos poliinsaturados (Figura 12b) de los productos analizados.

Tabla 14. Composición de hidrocarburos en los productos estudiados. Los valores reflejan porcentajes de hidrocarburos totales obtenidos a partir del análisis cromatográfico.

Hidr.	n ^a	<u>Undaria</u>	<u>Hijikia</u>	<u>Palmaria</u>	<u>Fucus</u>	<u>Chlorella</u>	<u>Spirulina</u>	<u>Spirulina</u>	<u>Spirulina</u>
		<u>pinnatifida</u>	<u>fusiforme</u>	<u>palmata</u>	<u>sp.</u>	<u>pyrenoidosa</u>	<u>sp.</u>	<u>platensis</u>	<u>maxima</u>
14	1	-	-	-	-	-	0.3	tr.	tr.
15	2	0.8	-	-	-	5.0	2.7	2.1	1.4
16	3	-	-	-	-	0.7	3.5	3.0	2.5
17:1	4	-	-	-	-	32.9	0.5	0.5	0.3
17	5	0.9	-	86.8	tr.	58.4	92.4	92.3	95.4
18	6	0.8	-	-	-	-	-	0.6	0.3
19	7	24.7	-	0.3	-	-	-	0.5	0.2
20	8	0.5	0.6	0.3	-	-	-	0.4	-
21	9	-	2.3	0.3	-	-	-	0.4	-
22	10	2.1	3.2	0.5	-	-	-	0.3	-
23	11	0.7	1.6	-	-	-	-	-	-
24	12	2.2	3.3	0.1	0.7	-	-	-	-
25	13	1.4	4.8	0.1	6.0	-	-	-	-
26	14	1.5	6.7	0.3	3.2	-	-	-	-
27	15	2.7	7.8	0.3	14.1	-	-	-	-
28	16	1.9	4.9	0.1	1.5	-	-	-	-
29	17	3.1	6.5	0.4	32.3	-	-	-	-
30	18	2.4	2.9	-	17.1	-	-	-	-
31	19	3.0	2.8	-	-	-	-	-	-
Total ^b		0.0022	0.0006	0.0021	0.0004	0.0277	0.2333	0.0280	0.0773

^a Números de identificación correspondientes a los cromatogramas (Figura 13).

^b En g/100g peso seco.

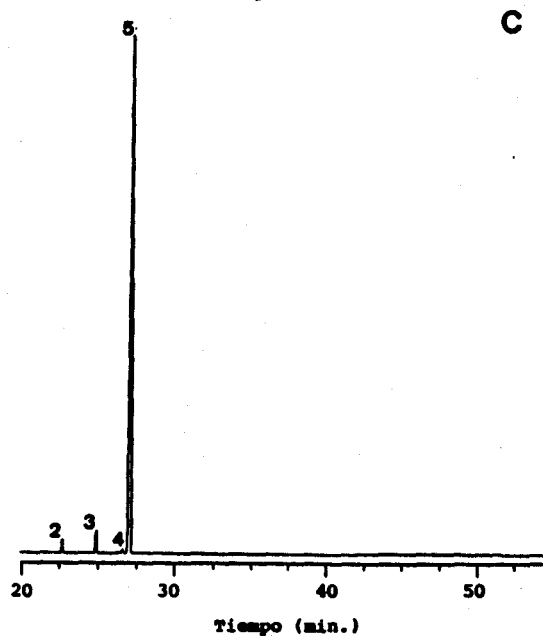
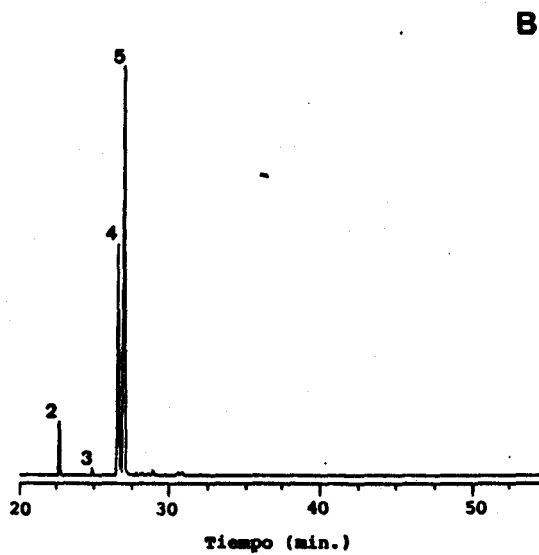
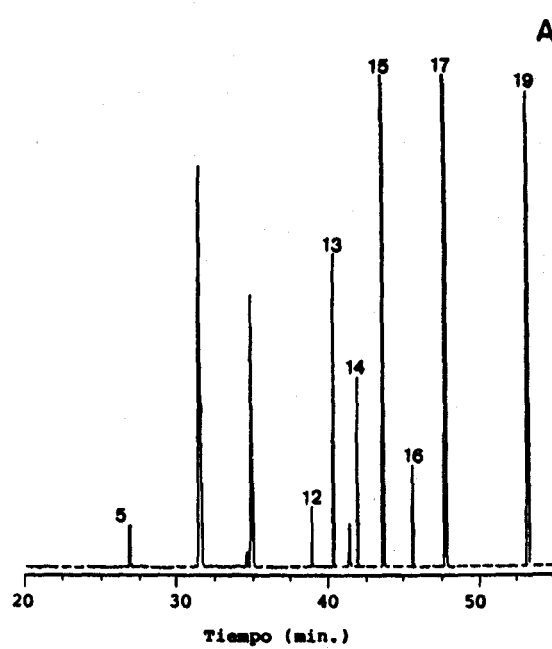


Figura 13. Cromatogramas representativos de la fracción de hidrocarburos de varios de los productos analizados. La identificación de los picos se refiere a la Tabla 14. A: "Fucus"; B: "Chlorella"; C: "Spirulina" (*S. maxima*).

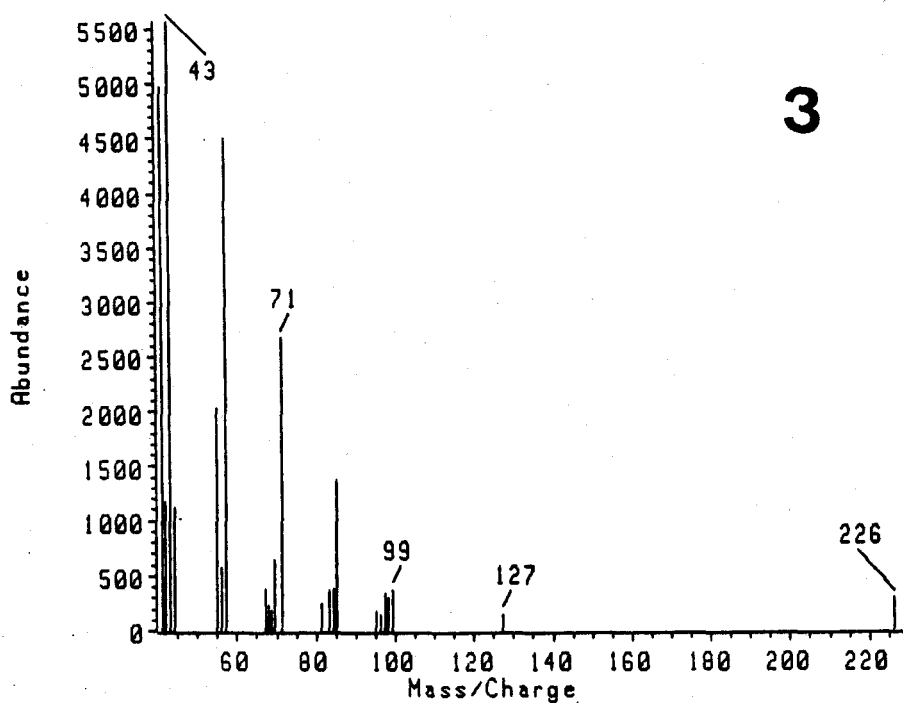
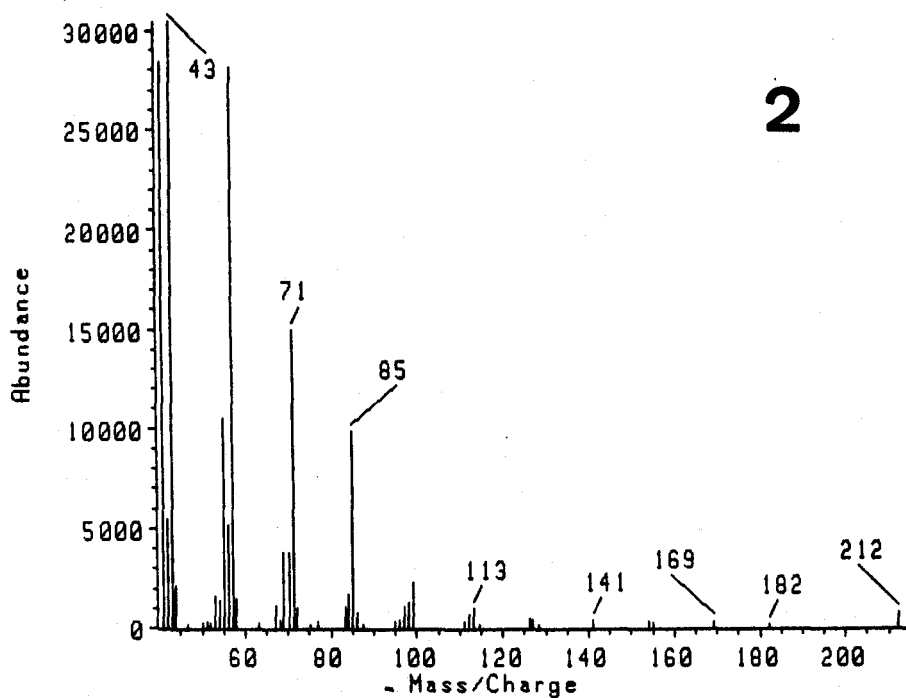


Figura 14. Espectros de masas de algunos de los hidrocarburos identificados. La numeración se refiere a la Tabla 14. 2: Pentadecano (C_{15}); 3: Hexadecano (C_{16}).

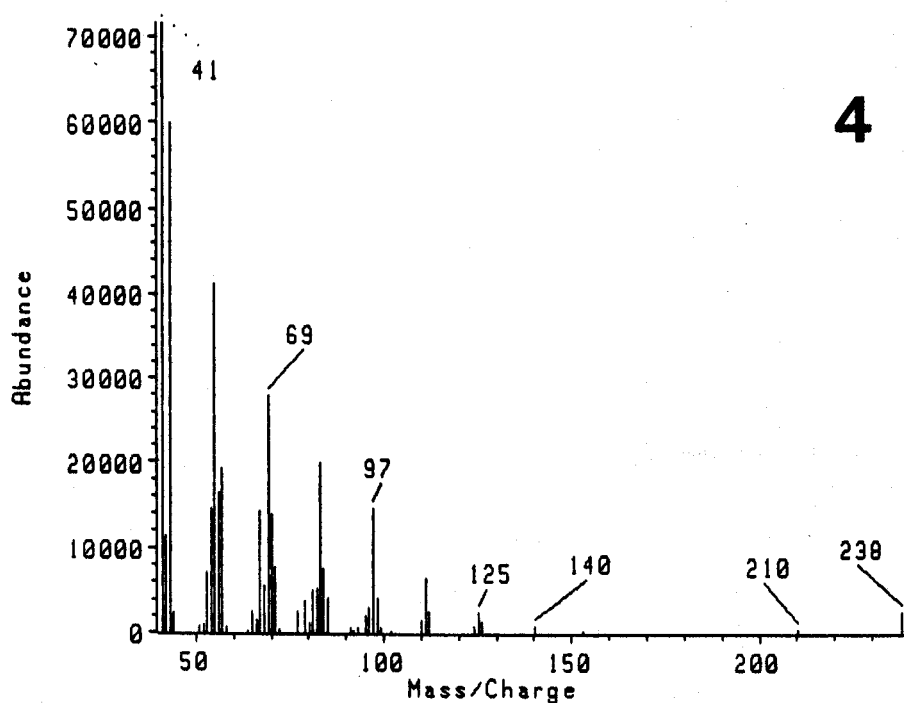
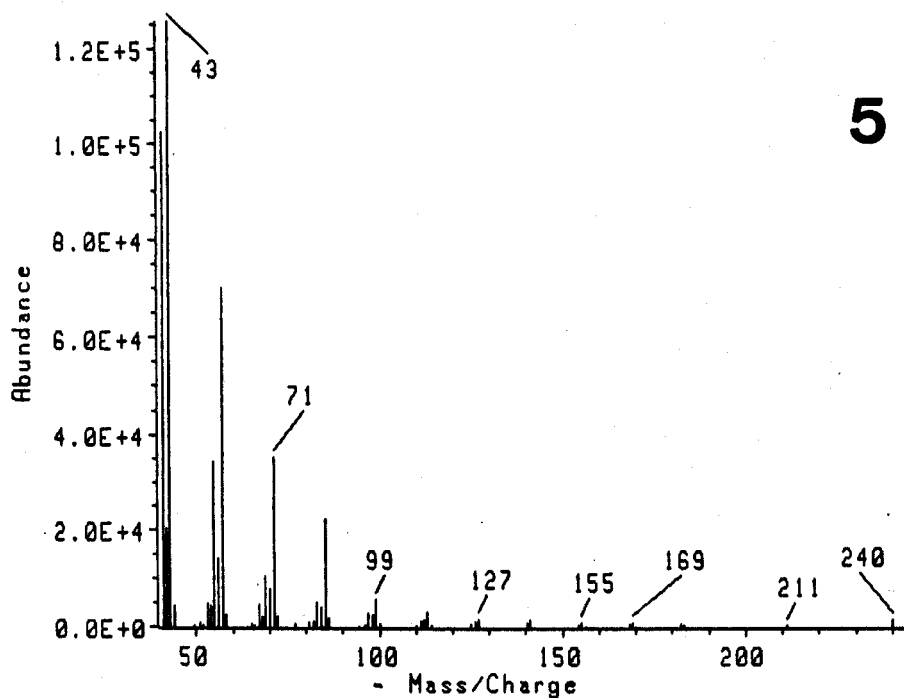


Figura 14 (Cont.). Espectros de masas de algunos de los hidrocarburos identificados. La numeración se refiere a la Tabla 14. 2: Heptadecano (C_{17}); 3: Heptadeceno ($C_{17:1}$).

hidrocarburos con un mayor número de carbonos, mientras que en los productos a base de microalgas predominaron los hidrocarburos con longitud de cadena entre 15 y 18 átomos de carbono. En los preparados a partir de macroalgas el porcentaje mínimo de hidrocarburos identificados fué 47.4% (Hijikia fusiforme). En cambio, prácticamente el 100% de los hidrocarburos fueron identificados en los productos con microalgas.

VI.2.1. "Wakame".

Los distintos análisis de los ácidos grasos de Undaria pinnatifida en la literatura muestran una notable variación ^{112,113,153}. Incluso la composición de ácidos grasos del alga puede variar del cuerpo del alga al esporófilo, lo que refleja diferentes procesos bioquímicos y fisiológicos ¹¹³. La composición de ácidos grasos encontrada en el producto es similar a la publicada por Pohl et al. ¹⁵² (Tabla 12). Las diferencias estriban principalmente en los ácidos grasos poliinsaturados de 18 y 20 átomos de carbono. La proporción de ácidos insaturados del producto (61%) es también muy similar a la publicada por Druehl para Undaria sp. (68%) ⁸. En cambio, es muy diferente a la composición encontrada por Sato ¹¹³, donde el ácido 16:0 supone una mayor proporción (49.6-60%), y los ácidos poliinsaturados de 20 átomos de carbono son menos abundantes (3.5-10.5%). Tampoco se encontró la alta proporción (49.3-53.9%) de ácidos poliinsaturados de 18 carbonos detectada por otros autores ^{112,153}.

Dentro de la fracción de hidrocarburos del producto, que constituía una parte minoritaria de los lípidos, se encontró como mayoritario n-nonadecano, presentándose cierta cantidad de hidrocarburos de cadena larga (hasta 31 carbonos).

VI.2.2. "Hijiki".

El contenido de ácidos grasos encontrado en el producto a base de Hijikia fusiforme, que supone un 57.1% de los lípidos totales, es muy similar al encontrado por otros autores (64.1%) ¹⁵³. El patrón de ácidos grasos está formado principalmente por ácidos de 14, 16, 18 y 20 átomos de carbono, como se muestra en el cromatograma de la Figura 10. La composición porcentual se asemeja, en líneas generales, a análisis anteriores (Tabla 12). La proporción del ácido 18:1 (26.8%) es sin embargo superior a la encontrada por otros autores (6.9-7.5%) ^{112,153}. Asimismo, no se detectaron cantidades apreciables de los ácidos poliinsaturados de 18 átomos de carbono, que en otros casos constituyen el 19.1-29.2% de los ácidos grasos. La proporción de ácidos poliinsaturados de 20 átomos de carbono (19.7%) sí se encuentra dentro del intervalo observado en otros análisis de H. fusiforme (18.2-28.2%). Esta alta proporción es típica de las algas feofíceas ¹²⁴.

En la fracción de hidrocarburos fueron identificados, al igual que en los otros productos con macroalgas, hidrocarburos de cadena larga de hasta 31 carbonos, teniendo cierta predominancia los hidrocarburos de 24 a 28 átomos de carbono.

VI.2.3. "Dulce".

En el producto con Palmaria palmata la composición de ácidos grasos observada presenta una gran diferencia con la obtenida en algas recogidas directamente de la naturaleza. El ácido 16:0 constituye un 65.8% de los ácidos grasos, frente a valores inferiores publicados anteriormente (19-25%) ¹⁰. En cambio, la proporción de 14:0, 19.3%, es similar (8.9-11.9%). El aumento de la proporción de 16:0 parece ser a costa de la desaparición de los ácidos grasos insaturados (0.7%), que suelen constituir un 58-75% del total de ácidos grasos en P.

palmata. Los ácidos poliinsaturados de 20 átomos de carbono, que suelen suponer de 11 a 45.5% del total ¹⁰, están totalmente ausentes en el producto analizado.

El contenido en hidrocarburos en P. palmata suele ser 0.003-0.02% ¹⁰. En los distintos análisis n-heptadecano es el hidrocarburo mayoritario, mientras que el resto está principalmente constituido por n-pentadecano ^{10,156,157}. Nuestros resultados con este alga coinciden básicamente con los de la literatura, aunque difieren en que no se detectó n-pentadecano, y sí los hidrocarburos con mayor número de átomos de carbono (19 a 29), presentes en cantidades pequeñas.

VI.2.4. "Fucus".

El producto elaborado a base de algas del género Fucus presenta un patrón de ácidos grasos similar a los otros productos con macroalgas, con ácidos de 14, 16, 18 y 20 átomos de carbono. El contenido relativo de ácidos grasos insaturados es inferior al publicado para distintas especies de Fucus ^{114,124}. Las proporciones de los ácidos grasos mayoritarios, 16:0, 18:1 y 14:0, son en cambio más altas (Tabla 12).

En las distintas especies de Fucus el contenido en ácidos poliinsaturados de 20 átomos de carbono oscila entre 17 y 38% ^{114,124}. Los valores obtenidos para el producto son, por tanto, ligeramente inferiores a lo publicado. En cambio, no se detectaron los ácidos poliinsaturados de 18 átomos de carbono, que suelen constituir del 16 al 29.5% de los ácidos grasos en las especies de Fucus.

Este producto fué el que presentó menor proporción de hidrocarburos de los productos estudiados, y no se detectaron hidrocarburos con un número de átomos de carbono inferior a 24. El hidrocarburo mayoritario fué n-nonacosano.

VI.2.5. "Chlorella".

En el producto con Chlorella pyrenoidosa hay una alta proporción del ácido esencial 18:2, aunque no aparece el ácido 18:3, muy común en los análisis de Chlorella (Tabla 13). C. pyrenoidosa cultivada en el laboratorio suele contener una proporción de 16:0 ligeramente inferior (7.9-21.4%) a la del producto analizado (25.1%), y una mayor proporción de ácidos grasos insaturados (68.6-88.1%)^{154,158,159} (frente a 60.1% del producto). C. vulgaris cultivada heterotróficamente en una planta piloto contiene un 20.4% de 16:0 y un 49.2% de ácidos insaturados, apareciendo en alta proporción el ácido 20:3 (20.8%)¹⁶⁰. Las especies Chlorella minutissima¹⁴⁴ y Chlorella kessleri¹⁶¹ también presentaron ácidos de más de 18 átomos de carbono, que estaban ausentes en el producto analizado.

Los valores obtenidos para el preparado de C. pyrenoidosa se encuentran dentro de lo esperado, dada la variabilidad que las condiciones ambientales introducen en la composición de ácidos grasos de Chlorella. Por ejemplo, cuando C. vulgaris es cultivada en el laboratorio en un medio con baja concentración de nitrógeno, el alga produce principalmente 16:0 (18.9%) y 18:1 (50.8%), y proporciones menores de ácidos poliinsaturados (26.5%)¹¹⁹. A altas concentraciones de nitrógeno, la cantidad de 18:1 es mucho menor (12.7%), mientras que aumenta la proporción de ácidos poliinsaturados (61.0%) y ligeramente la de 16:0 (22.6%). La evolución de la composición de ácidos grasos a lo largo del tiempo en un cultivo estanco es consistente con estos resultados, debido a la desaparición del nitrógeno en el medio¹²⁵. La luz estimula la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados en C. vulgaris¹²⁶, al igual que la composición de ácidos grasos de C. fusca también varía según sea cultivada de forma autótrofa o heterótrofa¹⁶².

El contenido en hidrocarburos así como los porcentajes relativos de los distintos hidrocarburos en Chlorella también presentan una gran variación en los distintos análisis de la

literatura. En el preparado de C. pyrenoidosa el contenido en hidrocarburos es muy similar al que presenta Chlorella sp. cultivada en condiciones heterótrofas (0.01-0.02%), frente a contenidos inferiores en C. kessleri (0.002%) y Chlorella sp. (0.001%) cuando se cultivan autotróficamente ¹⁶³. Los hidrocarburos mayoritarios de Chlorella suelen ser n-heptadecano y n-heptadeceno ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, aunque también se ha descrito alta proporción de n-hexadeceno, n-hexadecano y ciertas proporciones de hidrocarburos con más de 18 átomos de carbono, según la estirpe y condiciones de cultivo ^{163,164}. En el preparado analizado, además de los hidrocarburos mayoritarios n-heptadecano y n-heptadeceno, se detectó una proporción apreciable de n-pentadecano.

VI.2.6. "Spirulina".

El análisis de los ácidos grasos de los tres preparados de Spirulina dió en líneas generales resultados similares. Los tres presentaron como ácido graso mayoritario el 16:0, y en cierta proporción el 18:2 y el 18:3, ácidos grasos esenciales. El preparado más rico en ácidos grasos esenciales fué el de S. maxima (Figura 15).

La literatura sobre la composición lipídica y, en concreto, de ácidos grasos en Spirulina es abundante ^{71,116,119,140,154,165}. Existe una gran diversidad en la distribución de los ácidos grasos de las distintas especies y estirpes, tal como constataron Cohen et al.¹³³ al estudiar 19 estirpes distintas de Spirulina bajo las mismas condiciones de cultivo en el laboratorio. La composición incluso varía dentro de una misma estirpe al variar la temperatura de cultivo ^{129,133}. Esta variabilidad produce, por ejemplo, que la proporción de 16:0 oscile entre 26 y 70% en los distintos análisis. La proporción de ácidos grasos insaturados también varía considerablemente. Esta variación ocurre tanto entre los distintos estudios de laboratorio como con análisis del alga cultivada a gran escala. Por ejemplo Durand-Chastel ¹⁹

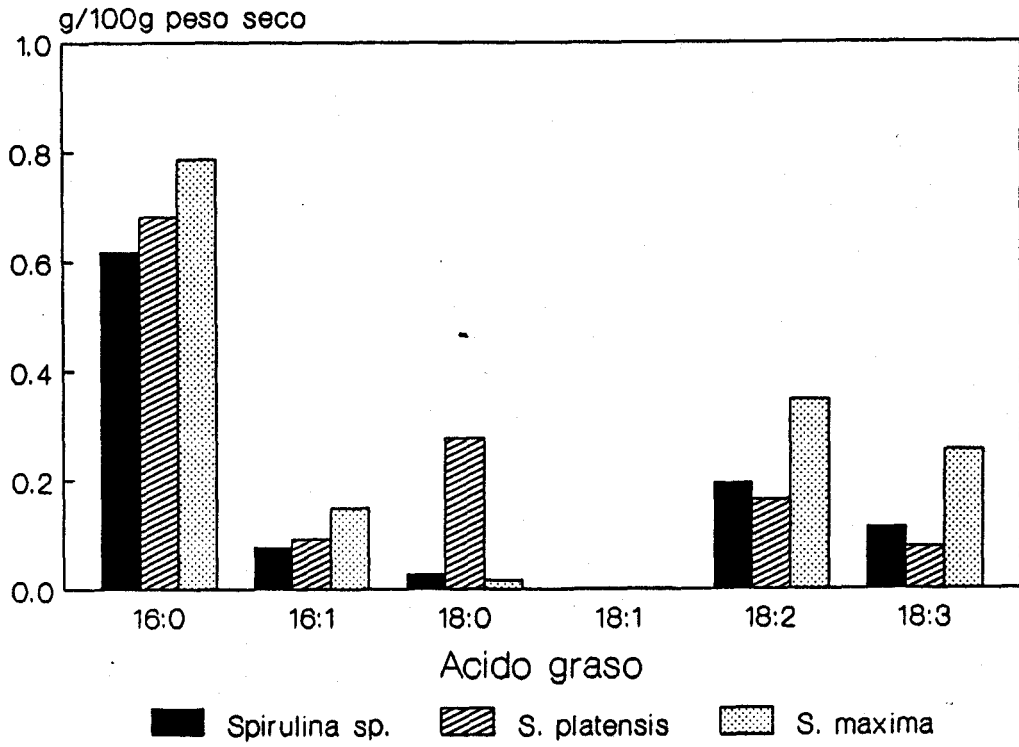


Figura 15. Perfil de ácidos grasos para los tres productos diferentes de "Spirulina" analizados.

encontró en S. maxima, cultivada en el lago Texcoco en Méjico, una variación de 4.9-5.7% en contenido de ácidos grasos, y una variación en el porcentaje relativo de 16:0 de 33.7-36.8%, y en el ácidos grasos insaturados de 51.1-59.3%. Sin embargo, Hudson y Caris ¹⁶⁶ habían encontrado en la misma especie cultivada igualmente en Texcoco un 63% de 16:0 en los ácidos grasos constituyentes de los lípidos polares (que suponían un 90.9% en peso de la fracción lipídica), al igual que un 50% en los no polares, lo que implica un porcentaje de 18:0 en el total de ácidos grasos mucho mayor que el publicado por Duran-Chastel ¹⁹. Igualmente, el contenido en ácidos grasos insaturados era 27% en los lípidos polares y 39% en los no polares. Los valores obtenidos para los preparados estudiados en el presente trabajo se acercan mucho más a la composición encontrada por Hudson y Caris ¹⁶⁶, al igual que a los publicados para S. platensis y S. maxima por Materassi et al. ¹⁵⁵ (Tabla 13).

La diferencia en el contenido de hidrocarburos en los tres preparados de Spirulina es consistente con la variación en los distintos resultados de la literatura con Spirulina cultivada en laboratorio (0.07-0.5%) ^{150,163}. El hidrocarburo mayoritario en los tres productos es n-heptadecano, mientras que hay menores proporciones de otros hidrocarburos de menor número de átomos de carbono, además del hidrocarburo insaturado n-heptadeceno. También fueron detectados en los preparados cantidades trazas de los hidrocarburos mayores, desde 18 a 31 átomos de carbono, especialmente en el producto con S. platensis. Esto está de acuerdo con los resultados previos ^{149,150}, aunque también se ha encontrado en S. platensis n-heptadeceno como hidrocarburo mayoritario, atribuido al bloqueo de la reacción de saturación de n-heptadeceno para dar n-heptadecano en la estirpe utilizada ¹⁶³.

VI.3. Discusión.

La composición de ácidos grasos e hidrocarburos alifáticos de los productos estudiados refleja claramente las diferencias bioquímicas existentes entre macroalgas y microalgas. Mientras que los productos con macroalgas presentan un patrón más complejo de ácidos grasos, de 14, 16, 18 y 20 átomos de carbono principalmente, las microalgas contienen ácidos con 16 y 18 átomos de carbono. Por otra parte, en los hidrocarburos de las macroalgas son abundantes los de cadena larga, mientras que en las microalgas el patrón es más sencillo, predominando los hidrocarburos de 17 átomos de carbono.

La riqueza en ácidos grasos poliinsaturados supone un índice del valor alimenticio de los lípidos de los alimentos. Se recomienda que un 8-10% de la energía tomada como alimento se deba a la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados ⁴⁴. Asimismo, la relación PIN/SAT de los ácidos grasos contenidos en la dieta debe ser superior a 0.45. Esto se cumple en 5 de los 8 productos analizados (Figura 12a), siendo el producto "Wakame" el que presenta una mayor relación PIN/SAT (1.01). El contenido absoluto en ácidos grasos poliinsaturados oscila en los productos analizados entre 0 y 0.6 g/100g peso seco (Figura 12b), siendo los productos con microalgas más ricos en ácidos grasos poliinsaturados que los de macroalgas.

El bajo contenido en lípidos de las macroalgas marinas feofíceas y rodofíceas no supone un aporte energético apreciable como constituyente de la dieta. Sin embargo, la alta proporción de los ácidos grasos poliinsaturados de 20 átomos de carbono se ha considerado relevante desde el punto de vista nutricional ⁷. Con la excepción de "Dulce", los productos con macroalgas analizados presentaban valores de estos ácidos grasos parecidos a los publicados previamente. Este hecho aumenta el valor nutricional de los preparados.

En el producto con P. palmata hay, por el contrario, una diferencia sustancial con los valores obtenidos en algas recogidas directamente de la naturaleza, en cuanto al contenido en ácidos grasos poliinsaturados. La comparación de la composición de ácidos grasos de este producto con lo descrito en la literatura indica que la alta proporción del ácido 16:0 va pareja a la desaparición de los ácidos grasos poliinsaturados. La alta proporción de 14:0 es comparable a la de los análisis anteriores. Estos resultados son explicables en base a una autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, proceso que se puede producir en alimentos que contienen grasas poliinsaturadas ¹⁶⁷.

La ausencia del ácido linolénico (18:3) en el producto con Chlorella es explicable en base a condiciones de cultivo heterotróficas. En efecto, cuando C. vulgaris es cultivada en el laboratorio en un medio orgánico, la proporción de ese ácido desciende drásticamente, en comparación a cuando se cultiva en condiciones autotróficas ¹²⁶. Incluso en C. vulgaris ¹⁶⁰ y C. kessleri ¹⁶⁸ cultivadas heterotróficamente en fermentador el ácido linolénico está ausente. Este hecho es atribuido a la asociación de este ácido graso con los lípidos de las membranas fotosintéticas ¹⁶⁹. La adición de una fuente de carbono orgánica (glucosa, acetato) a los cultivos de Chlorella es una práctica frecuente en las industrias dedicadas a la producción a gran escala de este alga para consumo humano ¹⁷⁰. Esto también concuerda con el bajo contenido en clorofila del preparado (1%), en comparación al 2-3% que alcanzan otros productos comerciales de Chlorella ²⁷. Asimismo, el contenido en hidrocarburos es equiparable al contenido observado en Chlorella cultivada heterotróficamente. Por tanto, la pérdida de determinados ácidos grasos poliinsaturados al utilizar condiciones heterotróficas en el cultivo de microalgas es un factor a tener en cuenta a la hora de proyectar procesos de producción en fermentadores con vistas a la obtención de ácidos grasos esenciales.

Otro proceso que puede tener un efecto sobre la presencia de este ácido graso poliinsaturado es la exposición al sol durante varios días de la biomasa producida en condiciones heterotróficas, práctica utilizada en algunas plantas de producción en Taiwan ¹⁵. Tal exposición, que aumenta la cantidad de clorofila en la biomasa, puede inducir además la fotooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, en analogía a lo que sucede a aceites ¹⁷¹ y diversos alimentos fritos ¹⁷² que contienen cierta cantidad de clorofila, al ser expuestos al aire y a la luz.

La alta proporción de ácido linolénico en Spirulina la convierte en una importante fuente de este ácido graso esencial, junto a otras como la leche humana y el aceite de la planta Oenothera biennis ¹³³. Se localiza principalmente en los galactosil diglicéridos, que son lípidos típicamente constituyentes de las membranas fotosintéticas ¹⁴⁰.

El contenido en ácido linolénico en Spirulina puede no obstante variar considerablemente según las condiciones ambientales. Por ejemplo, la variación según la temperatura de cultivo puede suponer de un 20 a más de un 50% del total de los ácidos grasos ^{129,133}. Los porcentajes relativos de este ácido en los productos son relativamente bajos en comparación con el valor del 20% que generalmente aparece en los estudios de Spirulina cultivada en laboratorio ^{119,133}, aunque, debido a la variabilidad, aparezcan en determinados casos proporciones relativas de 6-10% ^{154,155,165}, valores cercanos al presentado por estos preparados. Existen, sin embargo, escasos estudios en los que se aporten contenidos absolutos de este ácido graso en Spirulina. En el exhaustivo trabajo de Cohen et al. ¹³³ se presenta un contenido de 0.3 a 1.4% en peso seco libre de cenizas en las 19 estirpes estudiadas. En los productos con Spirulina los valores corregidos para el contenido en cenizas son ligeramente inferiores (0.09-0.27%). No obstante, el contenido en ácido linolénico de los preparados todavía hace que puedan ser considerados como una buena fuente de este ácido graso esencial. La suplementación de dietas deficientes

en ácidos grasos esenciales con Spirulina podría ser por tanto beneficiosa.

A pesar de la variabilidad de los distintos análisis de la literatura, todos ellos coinciden en que la proporción de 18:0 se mantiene en Spirulina bastante baja, no superior al 5%, e igual sucede con el resto de las cianobacterias. Esto ocurre con los productos de Spirulina sp. y S. maxima. Sin embargo, es considerablemente más alto (21.3%) el valor obtenido para S. platensis sp.. Esto hace que la proporción de ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados (PIN/SAT) sea inferior a la de los otros dos productos (Figura 12).

Este inusual resultado puede hacer pensar que el ácido 18:0 sea aportado por algún otro organismo. La contaminación por diferentes algas y por zooplancton puede representar un grave problema para los cultivos de microalgas realizados en estanques al aire libre. Especialmente en Spirulina, mantener a lo largo del año un cultivo monoalgal es a veces problemático, siendo Chlorella sp. el organismo que supone un mayor problema en ese sentido ^{173,174}. El descenso de la temperatura del cultivo en invierno favorece el crecimiento de C. vulgaris frente a Spirulina, pudiendo llegar a constituir hasta un 50% de la biomasa ¹⁷⁵. Sin embargo, es poco probable que el origen de esa proporción de 18:0 sea Chlorella u otra microalga, ya que en ellas este ácido graso es minoritario, no sobrepasando el 10% de los ácidos grasos totales ^{115, 116, 119, 124, 140, 154, 155, 165}. Tampoco el zooplancton parece ser la fuente, dada la ausencia de los ácidos n-eicosapentanoico y n-docosahexanoico, típicos en estos organismos ¹⁷⁶. La presencia de un organismo no fotosintético contaminante de los cultivos quizás podría ser el origen del ácido 18:0.

VII. AMINOACIDOS.

VII.1. Introducción.

Los aminoácidos constituyen la parte principal de los compuestos nitrogenados de las algas. Pueden estar en forma libre o formando parte de las proteínas. Estas pueden contener hasta un 80% o más del nitrógeno total presente en la biomasa de las algas ¹⁷⁷.

En las algas, los aminoácidos están íntimamente integrados en los sistemas de metabolismo intermediario asociados con la fotosíntesis y respiración. Los procesos fotosintéticos y respiratorios proveen los esqueletos carbonados de los aminoácidos. Estos incorporan el grupo amino a través de reacciones de aminación reductiva o de transaminación. Tras la formación de ácido glutámico a partir de α -cetoglutarato y amonio, mediante la glutamato deshidrogenasa, y de glutamina a partir de ácido glutámico, mediante la glutamina sintetasa, el grupo α -amino se distribuye entre los otros aminoácidos mediante reacciones de transaminación ¹⁷⁷.

Los aminoácidos más abundantes en las macroalgas marinas son ácido aspártico, ácido glutámico, glicina y alanina, mientras que se presentan menores cantidades de metionina, tirosina e histidina ⁷. Sin embargo, se dan profundas diferencias entre los distintos grupos de algas. Por ejemplo, las feofíceas carecen de cisteína, a diferencia de las rodofíceas y de las clorofíceas ¹⁷⁸. Además, el patrón de aminoácidos es en este grupo más uniforme que, por ejemplo, en las algas rojas, a pesar de profundas diferencias en estructura anatómica y ecología de las distintas especies ¹⁷⁸. En las microalgas también se caracteriza el perfil de aminoácidos por los bajos niveles de aminoácidos azufrados (cisteína y metionina) ²⁶.

La calidad nutricional de las proteínas de la dieta está determinada por su composición de aminoácidos. Mientras que las plantas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos,

los animales sólo pueden sintetizar una parte, que se denominan aminoácidos no esenciales. El resto, los aminoácidos esenciales, deben estar contenidos en la dieta. En el hombre los aminoácidos esenciales son once: histidina, isoleucina, leucina, lisina, cisteína, metionina, tirosina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina ⁴⁴. Cuanto mayor es la proporción de estos aminoácidos en las proteínas de un alimento mayor es su calidad nutricional.

Las proteínas de origen animal, presentes en la carne, aves, pescados, leche y queso, son las de mayor calidad en cuanto a su perfil de aminoácidos. Las proteínas procedentes de fuentes vegetales no suelen ser de tan buena calidad como las animales, debido a que algunos de los aminoácidos esenciales se encuentran en escasa proporción.

Los aminoácidos constituyentes de las proteínas de la dieta pasan a formar parte del "pool" de aminoácidos del cuerpo, que a su vez se utiliza para sintetizar las proteínas propias. Los aminoácidos esenciales se transforman irreversiblemente, y por eso es necesario reponerlos. Los aminoácidos no esenciales también son necesarios en cierta proporción en la dieta, ya que sirven como base para las transformaciones del "pool" corporal de aminoácidos ²¹.

Las proteínas de mayor calidad nutricional son las más costosas, lo cual constituye un problema en los países menos desarrollados. Esto ha conducido a la búsqueda de fuentes no convencionales de proteínas, de menor coste. Entre ellas se encuentra la proteína de microorganismos o SCP ("single cell protein"). Dentro de los microorganismos que se han estudiado como fuente potencial de proteínas han ocupado un lugar especial las microalgas, por su alto contenido en proteínas y por sus bajos requerimientos nutricionales, lo cual disminuye el coste de producción. No obstante, la producción comercial de biomasa de microalgas todavía no puede competir en cuanto a coste con las fuentes de proteínas convencionales. Los costes de producción pueden ser reducidos con la mejora de las

tecnologías de producción, recogida y deshidratación. El uso de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, que no requieren la adición al medio de cultivo de los caros fertilizantes nitrogenados, puede también reducir el coste de producción ¹⁷⁸.

VII.2. Resultados.

La composición de aminoácidos de los productos analizados se ve reflejada en la Tabla 15. Cromatogramas representativos de esta fracción aparecen en la Figura 16. Se pudieron observar unos niveles más altos de todos los aminoácidos en los productos con microalgas, dado su mayor contenido proteico (Tabla 1).

VII.2.1. "Wakame".

El producto con U. pinnatifida contuvo como aminoácidos más abundantes alanina, ácido glutámico, glicina y arginina. Dentro de los productos a base de macroalgas, fué el más rico en aminoácidos esenciales. Los resultados obtenidos son similares a los publicados en la literatura ^{8,22}.

VII.2.2. "Hijiki".

El perfil de aminoácidos obtenido se asemejó bastante al del producto "Wakame". Los aminoácidos mayoritarios en este producto fueron glicina, alanina y arginina.

VII.2.3. "Dulce".

En el producto con P. palmata predominaron también los aminoácidos glicina, alanina y arginina, además de ácido glutámico, que fué con diferencia el más abundante. Este producto, junto con "Fucus", fué el que presentó menor

Tabla 15. Composición de aminoácidos en los productos estudiados (g/100 g peso seco). Aparecen subrayados los aminoácidos esenciales.

Amino- ácido	n ^a	<u>Undaria</u> <u>pinnafitida</u>	<u>Hijikia</u> <u>fusiforme</u>	<u>Palmaria</u> <u>palmata</u>	<u>Fucus</u> <u>sp.</u>	<u>Chlorella</u> <u>pyrenoidosa</u>	<u>Spirulina</u> <u>sp.</u>	<u>Spirulina</u> <u>platensis</u>	<u>Spirulina</u> <u>maxima</u>
Asp	1	0.56	0.44	0.99	0.42	6.55	5.08	4.31	7.74
Glu	2	1.21	0.79	1.40	0.65	5.84	6.96	5.90	7.40
Ser	3	0.83	0.64	0.76	0.54	2.99	3.29	3.05	3.79
Gli	4	1.19	1.05	0.99	0.75	4.40	4.16	3.63	4.14
His	5	0.31	0.19	0.14	0.16	1.44	1.05	0.88	1.17
Arg	6	1.09	1.03	0.92	0.75	5.43	6.21	5.60	6.88
<u>Tre</u>	7	0.89	0.83	0.68	0.64	3.72	3.93	3.73	4.22
Ala	8	2.06	1.03	0.92	0.66	6.11	5.80	5.00	6.11
Pro	9	0.73	0.79	0.62	0.56	3.33	2.79	2.56	3.02
<u>Tir</u>	10	0.79	0.68	0.56	0.48	3.56	4.16	4.87	5.02
<u>Val</u>	11	0.71	0.72	0.59	0.42	0.45	4.95	4.95	5.77
<u>Met</u>	12	0.31	0.30	0.18	0.16	1.15	0.75	1.13	1.35
<u>Cis</u>	13	0.05	0.00	0.08	0.01	0.20	0.32	0.19	0.43
<u>Ile</u>	14	0.27	0.32	0.19	0.17	2.05	2.74	2.70	2.90
<u>Leu</u>	15	0.44	0.47	0.34	0.25	3.86	3.89	3.61	3.81
<u>Fen</u>	16	0.19	0.15	0.08	0.10	1.14	1.05	0.98	0.93
<u>Lis</u>	17	0.88	0.59	0.68	0.55	3.89	3.74	3.50	4.21

^a Números de identificación en los correspondientes cromatogramas (Figura 16).

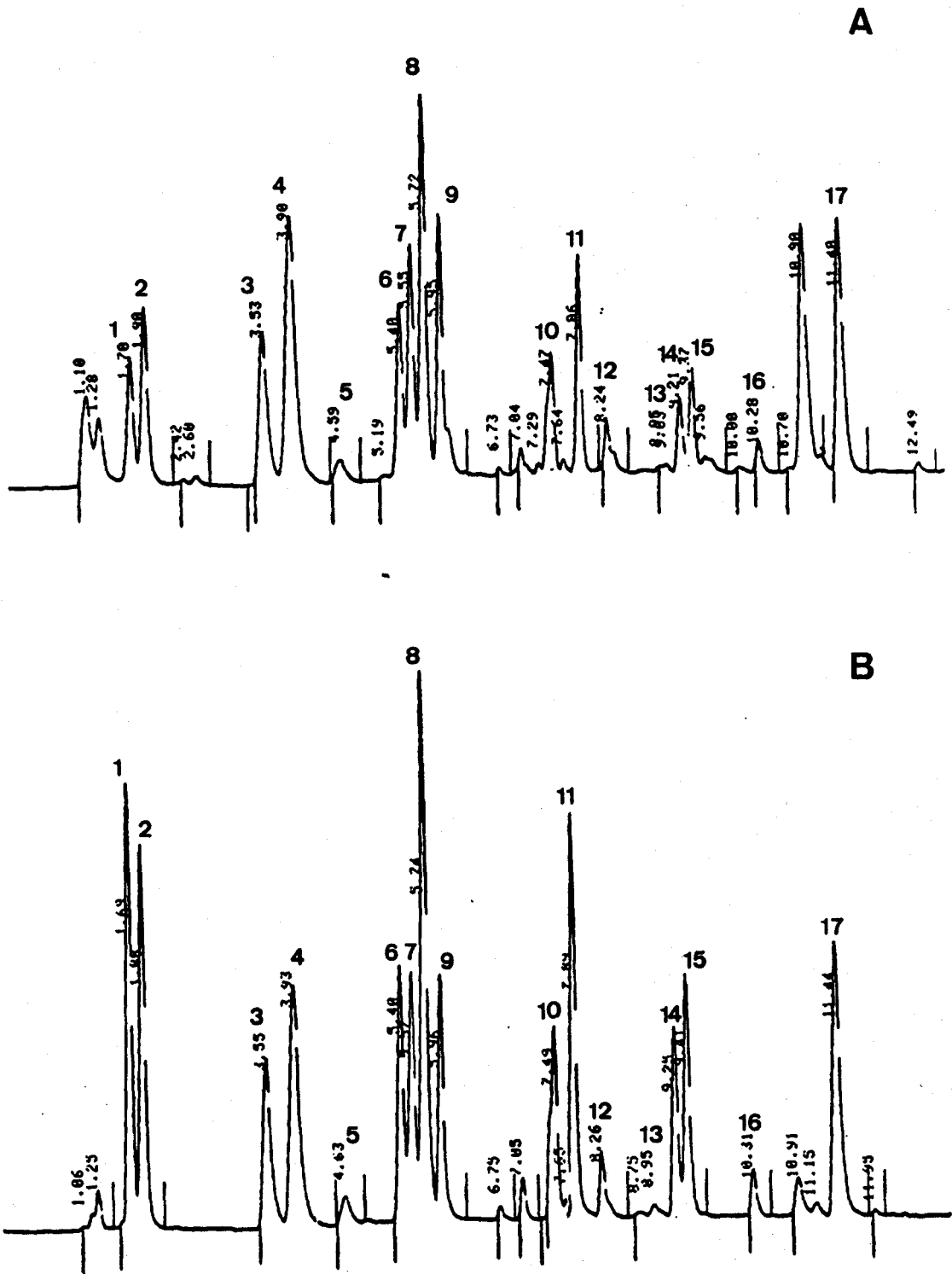


Figura 16. Cromatogramas representativos de la fracción de aminoácidos de dos de los productos analizados. La identificación se refiere a la Tabla 15. A: "Fucus". B: "Spirulina" (*S. maxima*).

contenido en aminoácidos esenciales entre todos los productos estudiados. Los bajos niveles de metionina, histidina y cisteína están en concordancia con análisis previos de los aminoácidos de P. palmata ¹⁰. El contenido en fenilalanina del producto es sin embargo bajo en comparación a los valores publicados (0.71-1.44%). La prevalencia de los aminoácidos básicos y la baja concentración de aminoácidos básicos es típica de las rodofíceas.

VII.2.4. "Fucus".

Este producto fué el más pobre en aminoácidos esenciales de los productos estudiados, además de presentar el contenido proteico más bajo (Tabla 1). El contenido en compuestos nitrogenados de los miembros del orden Fucales depende notablemente de la estación y del hábitat, siendo por ejemplo mayor el contenido proteico en algas recogidas de estuarios ¹⁷⁸. La prevalencia de los aminoácidos glicina y arginina en el producto analizado difiere de análisis previos de F. vesiculosus, que muestran mayores niveles de ácido aspártico, ácido glutámico y alanina ¹⁷⁸.

VII.2.5. "Chlorella".

Los aminoácidos mayoritarios en este producto de microalgas fueron ácido aspártico, alanina, ácido glutámico y glicina. El contenido en los aminoácidos esenciales histidina y fenilalanina fué el mayor de los estudiados. En el resto de los aminoácidos esenciales, los niveles fueron inferiores que los presentes en los productos con Spirulina. Los resultados obtenidos son similares a los publicados para las distintas especies de Chlorella ²⁶, con la excepción de que la proteína de este producto es especialmente deficitaria en el aminoácido esencial valina.

VII.2.6. "Spirulina".

Los tres productos a base de Spirulina dieron un patrón similar de aminoácidos, predominando los mismos que en el de "Chlorella". El producto de S. maxima fué el más rico en la mayor parte de los aminoácidos esenciales de los estudiados. Los resultados obtenidos son similares a los publicados en la abundante literatura sobre la composición de la proteína de este género de cianobacterias ^{20,26,70,71,180-183}.

VII.3. Discusión.

Los análisis de aminoácidos fueron un reflejo del mayor contenido en proteínas de los productos con microalgas, en comparación a los de macroalgas. El alto contenido en proteínas de los productos con microalgas hace que el perfil de aminoácidos de los mismos forme una parte importante en su valoración como alimento. En la Tabla 16 aparece la composición de aminoácidos de una proteína "ideal" desde el punto de vista nutricional, elaborada por la Organización Mundial de la Salud, junto a la del huevo y a la de los productos de microalgas analizados, corregida para el contenido en nitrógeno (se refiere a 16 g de N dado que ese es el contenido medio de N en 100 g de proteína).

Los productos con Spirulina tienen un patrón de aminoácidos notable cuando se comparan con el standard de la OMS. Con la excepción de cisteína, los demás aminoácidos están presentes en concentraciones adecuadas. En comparación con la proteína del huevo, la proteína de Spirulina es algo inferior en cuanto al contenido en aminoácidos azufrados y al de cisteína. No obstante, se encuentra entre las mejores del mundo vegetal, siendo de mayor calidad, por ejemplo, que la de las leguminosas ¹⁸¹. La composición de aminoácidos de Spirulina varía con las condiciones de cultivo, siendo posible elevar el contenido en aminoácidos azufrados añadiendo sulfato al medio ²⁰. También se han aislado mutantes con alto contenido en

Tabla 16. Composición de aminoácidos en los productos estudiados (g/16 g N). Aparecen subrayados los aminoácidos esenciales.

Aminoac.	OMS	Huevo	<u>Chlorella</u> <u>pyrenoidosa</u>	<u>Spirulina</u> <u>sp.</u>	<u>Spirulina</u> <u>platensis</u>	<u>Spirulina</u> <u>maxima</u>
Asp	-	11.0	11.7	8.3	7.6	11.2
Glu	-	12.6	10.4	11.4	10.4	10.7
Ser	-	6.9	5.3	5.4	5.4	5.5
Gli	-	4.2	7.9	6.8	6.4	6.0
Arg	-	6.2	9.7	10.2	9.9	10.0
Ala	-	-	10.9	9.5	8.8	8.9
Pro	-	4.2	6.0	4.6	4.5	4.4
His	-	2.4	2.6	1.7	1.6	1.7
<u>Tre</u>	4.0	5.0	6.6	6.5	6.6	6.1
<u>Tir</u>	6.0 ^a	4.2	6.4	6.8	8.6	7.3
<u>Fen</u>		5.8	2.0	1.7	1.7	1.3
<u>Val</u>	5.0	7.2	0.8	8.1	8.7	8.4
<u>Met</u>	3.5 ^b	3.2	2.1	1.2	2.0	2.0
<u>Cis</u>		2.3	0.4	0.5	0.3	0.6
<u>Ile</u>	4.0	6.6	3.7	4.5	4.8	4.2
<u>Leu</u>	7.0	8.8	6.9	6.4	6.4	5.5
<u>Lis</u>	5.5	7.0	6.9	6.1	6.2	6.1

^a Tir + Fen

^b Met + Cis

metionina ²⁰. Además, la calidad nutricional in vivo de la proteína de Spirulina, aunque inferior a la de proteínas animales como la caseína, es superior a la de otras fuentes vegetales como por ejemplo la soja ¹⁸⁴. Por tanto, el alto contenido en proteína junto a su composición en aminoácidos y a su disponibilidad biológica hacen de Spirulina una fuente de proteína no convencional de notable interés.

VIII. MATERIAL Y METODOS.

VIII.1. Recogida de las muestras.

Previamente a la toma de muestras se procedió a conocer la gama de productos comestibles fabricados a base de algas en el mercado español, solicitando información como simple consumidor directamente en los establecimientos o mediante correspondencia con las casas fabricantes. Tras recabar esta información se seleccionaron para el presente estudio 8 productos. De cada producto se recogieron 3 lotes distintos, adquiriéndolos en establecimientos escogidos al azar en Sevilla, Madrid y Barcelona.

VIII.2. Preparación de las muestras.

Las muestras se conservaron en un lugar oscuro y seco. Los productos envasados en bolsas de plástico se trituraron primero en molinillo y después en mortero, y se conservaron en recipientes herméticos hasta su análisis. Los productos consistentes en comprimidos o cápsulas se conservaron en el envase original, hasta que fueron triturados en mortero antes del análisis.

VIII.3. Determinación de la composición química general.

VIII.3.1. Humedad.

El agua residual o humedad se determinó por diferencia de peso en 1 g de materia húmeda mantenida durante 4 h a 103 °C.

VIII.3.2. Proteína bruta.

La cantidad de proteína se estimó multiplicando por 6.25 la cantidad de nitrógeno total. El contenido de nitrógeno total se determinó según el método de Nehring ¹⁸⁵. Tras añadir ácido salicílico y tiosulfato sódico, el material se atacó con

H₂SO₄ a ebullición, en presencia de un catalizador. A continuación se destiló en un exceso de sosa y se valoró el amoniaco desplazado con HCl 0.02 N en presencia del indicador Tashiro.

VIII.3.3. Hidratos de carbono.

Para la determinación de los hidratos de carbono se utilizó el método del fenol-ácido sulfúrico ¹⁸⁶, frente a glucosa ("Dulce" y productos con microalgas) o frente a una mezcla (85:15) de ácido glucurónico y glucosa ("Wakame" e "Hijiki"). Distintas alícuotas procedentes de la hidrólisis ácida del Apartado VIII.5.2.1. se diluyeron hasta 2 ml con agua y se le añadieron 50 ul de reactivo fenol (10 ml de agua por 90 ml de solución de fenol al 90%). A continuación se añadieron rápidamente 5 ml de H₂SO₄ al 95.5 % y se agitó durante 15-20 s. Tras media hora se midió la absorbancia a 485 nm. La concentración de hidratos de carbono se determinó gráficamente a partir de la recta patrón.

En el producto "Fucus" la proporción de hidratos de carbono se calculó a partir del valor R (véase Apartado VIII.4.2.) ²³:

$$P \times 42 + C \times 28 + L \times 67.5 = R \times 100$$

siendo P, C y L los porcentajes en peso seco de proteína bruta, hidratos de carbono y lípidos, respectivamente.

VIII.3.4. Lípidos.

La proporción de lípidos se determinó con el método del reactivo de vainillina ¹⁸⁷, frente a una mezcla de los ácidos grasos palmítico y esteárico (3:1). A alícuotas de 1 ml de los extractos obtenidos según el procedimiento del Apartado VIII.6.2. se le añadieron 3 ml de H₂SO₄ al 95.5 %. A

continuación se mantuvieron a 100 °C durante 15 min. Tras enfriar, a 0.5 ml del hidrolizado se añadieron 2 ml de reactivo de vainillina (494 mg de vainillina más 200 ml de H₃PO₄ al 85 %, añadiendo después 50 ml de agua). Se homogeneizó, se dejó reposar 30 min a 30 °C, y se midió absorbancia a 530 nm. La concentración de lípidos se determinó gráficamente a partir de la recta patrón.

VIII.3.5. Ácidos nucleicos.

La determinación de los ácidos nucleicos se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm en extractos obtenidos con HClO₄ 0.5 N tras mantener durante 30 min a 70 °C ($E_{cm}^{mg/ml} = 28$)¹⁸⁸.

VIII.3.6. Clorofila a.

10 mg de muestra se extrajeron 3 veces con 5 ml de metanol en baño de agua hirviendo durante 3 min. Tras enfriar y centrifugar, se midió la absorbancia a 665 nm en los extractos ($E_{cm}^{mg/ml} = 76.07$).

VIII.4. Análisis elemental.

VIII.4.1. Porcentaje de cenizas.

El porcentaje de cenizas se determinó por diferencia de peso en 1 g de materia húmeda mantenida durante 2 h a 500 °C.

VIII.4.2. Carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre.

Los análisis de C, H, N y S se efectuaron en dos instrumentos Carlo Erba modelos 1106 y 1500. El valor de R se

calculó a partir de los resultados del análisis elemental según la fórmula de Spoehr y Milner ²³:

$$R = \frac{(\%C \times 2.664 + \%H \times 7.936 - \%O) \times 100}{398.9}$$

VIII.4.3. Mineralización de las muestras.

Para el análisis de los elementos P, K, Ca, Mg, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni y Co mediante la técnicas del Apartado VIII.4.4., se mineralizaron las muestras por vía seca. Tras secar el material durante 16 h a 70-80 °C, se pesó 1 g de muestra en cápsula de porcelana o platino. Se mantuvo durante 2 h en horno mufla a 450 °C, después de haber colocado la cápsula en el horno frío y subir hasta esa temperatura. A continuación se humedecieron las cenizas con 2 ml de agua, y se añadieron 5 ml de HClO₄ 1:4, 5 ml de H₃NO 1:4 y 5 ml de HF. Se llevó a sequedad en placa caliente bajo vitrina. Una vez seca, se añadió HCl concentrado y unos ml de agua. Se calentó ligeramente hasta la aparición de humos, se filtró y se diluyó hasta 30 ml con agua.

Para el análisis por ICP-AES (Apartado VIII.4.6.), se utilizó la oxidación por vía húmeda con ácido nítrico y ácido perclórico, según el método de McQuaker et al. ¹⁸⁹ para análisis por ICP-AES, con ciertas modificaciones. Las digestiones se realizaron en vasos de precipitado de 150 ml de capacidad, sobre un baño de arena a 100 °C, y bajo vitrina. Se digirió 1 g de muestra en presencia de 3 alícuotas sucesivas de 10 ml de H₃NO; tras cada adición las muestras se llevaron hasta casi sequedad. La evaporación hasta casi sequedad después de cada adición resultó ser un factor crítico para la digestión de las muestras. Después se añadió 5 ml de HClO₄ y se evaporó hasta aproximadamente 1 ml. Se filtró y se diluyó hasta 50 ml con agua.

VIII.4.4. Análisis de elementos mayoritarios y minoritarios.

El fósforo se determinó en las soluciones obtenidas en el apartado VIII.4.3. por el método colorimétrico del fosfovanadio molibdeno ¹⁹⁰. Para el análisis del potasio y el sodio se utilizó la fotometría de llama ¹⁹⁰. El resto de los elementos se determinó por espectrofotometría de absorción atómica en aparato Perkin-Elmer mod. 703 y lámparas de cátodo hueco de cada elemento ¹⁹¹.

VIII.4.5. Estudio de la distribución de los elementos en los productos con macroalgas.

Para cada producto con macroalgas se calculó el factor de concentración y según Yamamoto et al. ³². Para ello se tomaron la concentración de cada elemento en el alga húmeda (suponiendo un valor original de 75% de agua) y la concentración en el agua marina (Tabla 3). Se representaron gráficamente para cada lote los valores de $\log y$ frente a los de $\log x$ (siendo x el tiempo de residencia oceánica - Tabla 3). Los valores de $\log a$ y de b se calcularon según el método de los mínimos cuadrados de la fórmula (2) (pág.), representándose asimismo en cada gráfica la recta de regresión correspondiente. El coeficiente de correlación estimado r entre $\log x$ y $\log y$ también se calculó a partir de los datos.

VIII.4.6. Análisis por espectroscopía de emisión con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES).

VIII.4.6.1. Aparato y condiciones de análisis.

Los análisis se realizaron en un aparato Perkin/Elmer ICP 5500 Secuencial. Las condiciones de operación fueron: Frecuencia: 27.12 MHz. Potencia RF incidente: 1.25 Kw; Potencia RF reflejada: menor de 5 W; Gas plasmógeno (Argon):

15 l/min; Gas auxiliar (Argon): 0 l/min; Gas portador aerosol (Argon): 0.35 l/min; Presión nebulizador: 30 psi; Altura de observación: 15 mm; Longitudes de onda analíticas: 240.49 nm (Fe), 257.61 nm (Mn), 279.55 nm (Mg), 317.93 nm (Ca), 324.75 nm (Cu), 589.59 nm (Na) y 766.50 nm (K).

VIII.4.6.2. Selección de longitudes de onda analíticas, estudio de interferencias y standards utilizados.

Para la selección de las longitudes de onda analíticas se consultaron tanto trabajos precedentes ^{192,193} como tablas de líneas de emisión ¹⁹⁴. Para evitar las interferencias espectrales se seleccionaron en lo posible líneas de emisión que no tuvieran cerca ninguna otra en un intervalo de 0.2 nm, sobre todo correspondiente a algún elemento mayoritario. Para comprobar si realmente no existían interferencias, se comparó la emisión a la longitud de onda seleccionada de una solución patrón del elemento con la de soluciones de los elementos mayoritarios a una concentración 100 o más veces superior. No se observaron diferencias entre la emisión del blanco con la de las soluciones de los elementos mayoritarios.

Para la calibración del aparato se utilizaron los standards certificados NBS 1572 (hojas de Citrus), BCR 60 (planta acuática) y NIES 3 (Chlorella), digeridos del mismo modo que las muestras, y soluciones sintéticas de Fischer Scientific Co. (Fair Laws, New Jersey, EE.UU.).

VIII.5. Determinación de la composición de azúcares.

VIII.5.1. Preparación del material y disolventes.

El material de vidrio utilizado en estos análisis así como en los de lípidos (Apartado VIII.6.1.) se lavó con un detergente alcalino (Extran AP 13, Merck) y posteriormente con agua destilada para eliminar posibles contaminantes.

Todos los disolventes orgánicos se destilaron antes de uso mediante una columna (80 x 4 cm) rellena de anillos "rashig" (2 mm) y se sometieron a un control por cromatografía de gases para comprobar la ausencia de compuestos contaminantes que interfirieran con los análisis.

VIII.5.2. Extracción y purificación.

El proceso de extracción, purificación y análisis de los azúcares fue básicamente el descrito por Moers et al. ¹⁹⁵. El método consiste en la transformación en acetatos de alditol de los sacáridos neutros obtenidos tras hidrólisis con ácido sulfúrico. La transformación se consigue mediante la reducción de las aldosas a alditoles, seguida de la acetilación de los alditoles a acetatos de alditol.

VIII.5.2.1. Hidrólisis.

A 1 g de materia húmeda se añadieron 60 ml de agua destilada. Mientras se agitaba, se añadió HCl concentrado gota a gota, hasta el cese del desprendimiento de CO₂. Después de lavar con agua destilada, se liofilizó el residuo. A continuación se le añadieron 30 ml de H₂SO₄ 12 M y se mantuvo durante 2 h a temperatura ambiente. El ácido se diluyó hasta 1 M y se efectuó la hidrólisis durante 4.5 h a 100 °C.

VIII.5.2.2. Neutralización.

El sobrenadante ácido se neutralizó con BaCO₃ y se añadió 0.3 ml de mioinositol (0.5 mg/ml) como patrón interno. El precipitado se eliminó por centrifugación y se lavó 2 veces con agua destilada, añadiéndose el agua de lavado al sobrenadante. El pH de la solución se llevó a 9 ó 10 mediante la adición de trietilamina, manteniéndose a continuación en

reposo durante media hora para permitir la hidrólisis de las lactonas.

VIII.5.2.3. Formación de alditoles.

La reducción de las aldosas liberadas a alditoles se realizó mediante la adición de NaBH_4 . La mezcla de reacción se mantuvo en reposo a temperatura ambiente durante 16-20 h. El exceso de NaBH_4 se descompuso mediante la adición de ácido acético glacial. La solución se evaporó en rotavapor al vacío. El ácido bórico se eliminó mediante repetidas adiciones de metanol y evaporación a sequedad. Para eliminar el remanente de agua se añadió anhídrido acético y la mezcla se mantuvo a $100\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h.

VIII.5.2.4. Formación de acetatos de alditol.

Después de evaporar a sequedad en vacío, se acetiló añadiendo 5 ml de piridina y de anhídrido acético, manteniendo la mezcla de reacción a $100\text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 h. La mezcla resultante conteniendo los acetatos de alditol se evaporó en rotavapor a vacío y se desecó sobre P_2O_5 y KOH.

A continuación se añadió 5 ml de agua, y la mezcla se extrajo 3 veces con 5 ml de diclorometano. Los extractos obtenidos se mezclaron y, después de eliminar el agua con Na_2SO_4 , se evaporó a sequedad al vacío. La mezcla de alditoles se resuspendió 1 ml de acetato de etilo. La suspensión se purificó a través de una pequeña columna de Sílica 60 (70-230 mesh ASTM, Merck). La columna se lavó con acetato de etilo y el eluyente se concentró para ser analizado por cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

VIII.5.3. Análisis por cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard mod. 5890 con detector de ionización de llama y columna capilar CPsil88 de 25 m, d.i.=0.32 mm y df=0.12 μ m (Chrompack, Middelburg, Holanda). Las condiciones de análisis en el cromatógrafo de gases fueron: detector de ionización de llama y modo de inyección "on column"; gas portador: helio (1 ml/min); flujos de aire e hidrógeno: 400 ml/min y 30 ml/min, respectivamente; temperatura del inyector: 300 °C; temperatura del detector: 330 °C; programa de temperaturas del horno: Las muestras se inyectaron a 70 °C. La temperatura del horno se subió inmediatamente después a 150 °C, programándose a continuación a 3 °C/min hasta una temperatura final de 230 °C; tiempo final, 40 min. El cromatógrafo estaba conectado a una estación de trabajo para cromatografía Maxima 820 (Millipore, EE.UU.), que permitía el tratamiento y acumulación de los cromatogramas.

Los distintos acetatos de alditol correspondientes a los azúcares neutros se identificaron comparando sus espectros de masas con los de librería, así como con los tiempos de retención y espectros de masas de compuestos standards.

Los espectros de masas se obtuvieron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard mod. 5890 acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo Hewlett Packard mod. 5988A, operando con impacto electrónico a 80 eV y con un ciclo de 2 s. Las condiciones cromatográficas fueron idénticas a las anteriores.

VIII.5.4. Análisis cuantitativo.

Los azúcares neutros se cuantificaron a partir del patrón interno (hexaacetato de mioinositol), integrando el área de los picos mediante la estación de trabajo Maxima. Se asumió

que todos los factores de respuesta de los acetatos de alditol eran iguales.

VIII.6. Determinación de la composición de ácidos grasos e hidrocarburos alifáticos.

VIII.6.1. Preparación del material, solventes y reactivos.

Se tomaron las mismas precauciones que en el Apartado VIII.5.1.. La alúmina (70-230 mesh, Merck) y la lana de vidrio para las columnas de cromatografía se extrajeron antes de su uso en Soxhlet con una mezcla de diclorometano:metanol (2:1), y se secaron a temperatura ambiente. La alúmina se activó manteniéndola durante 12 h a 350 °C en un horno mufla. Tras dejar enfriar, se añadió agua destilada hasta 5 %, gota a gota, y la mezcla se agitó suavemente para homogeneizarla. La alúmina así preparada se utilizó en plazo máximo de 48 h.

VIII.6.2. Extracción y saponificación.

Para la extracción de los lípidos se partió de 1 g de muestra, extrayéndose 5 veces en tubos de centrifuga de vidrio con 15 ml de una mezcla de diclorometano:metanol (2:1), sonicando 10 minutos. El extracto se concentró en rotavapor hasta un volumen final de 10 ml, y se tomó una alícuota para la determinación de lípidos totales (Apartado VIII.3.4). Para la saponificación del extracto, se añadieron 30 ml de una solución de KOH en metanol al 6% y se mantuvo a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante 12 horas.

VIII.6.3. Separación.

La fracción insaponificable se extrajo con hexano (20 ml, 3 veces). La fracción saponificable se acidificó con una disolución de HCl al 25% hasta pH 2, y los ácidos libres se extrajeron con hexano. La fracción insaponificable se evaporó en rotavapor hasta un volumen final de 2 ml y se cromatografió en columna de alúmina (1 x 18 cm), previamente desactivada con 5% de agua bidestilada. Se eluyó un volumen de hexano igual al volumen muerto de la columna. El eluyente contenía la fracción de hidrocarburos alifáticos, que fue analizada por cromatografía de gases.

VIII.6.4. Metilación.

El extracto de ácidos grasos se evaporó en rotavapor hasta un volumen final de 2 ml, y se añadieron 3 ml de trifluoruro de boro en metanol, dejando en reposo durante 12 h a temperatura ambiente. A continuación se añadió agua bidestilada (10 ml) y se extrajeron los correspondientes ésteres metílicos con hexano (30 ml, 3 veces). El extracto conteniendo los ácidos grasos metilados, se concentró y se analizó por cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas.

VIII.6.5. Análisis por cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas.

El cromatógrafo de gases y el software utilizados fueron los referidos en el Apartado VIII.5.3. Se utilizó una columna capilar HP-5 (25 m x 0.2 mm i.d.) con espesor de fase estacionaria de 0.15 μm ; temperatura del inyector: 300 °C; temperatura del detector: 330 °C; programa de temperaturas del horno: desde 60 °C hasta 300 °C, a 6 °C/min; manteniéndose la temperatura final durante 10 min.

Los compuestos se identificaron comparando sus espectros de masas con los de librería, así como con los tiempos de retención y espectros de masas de compuestos standards. El espectrómetro de masas utilizado se describió en la sección VIII.5.5., utilizándose las mismas condiciones cromatográficas a las anteriores.

VIII.6.6. Análisis cuantitativo.

Los ácidos metilados se cuantificaron por comparación con un patrón externo formado por una mezcla de los ésteres metílicos de los ácidos 16:0 (ácido palmítico) y 18:0 (ácido esteárico). Los hidrocarburos se cuantificaron de forma similar usando como standard una solución de heptadecano. La integración de los picos se realizó mediante la estación de datos computerizada.

VIII.7. Análisis de aminoácidos.

VIII.7.1. Hidrólisis.

Las muestras se hidrolizaron con HCl 6N a 110° C durante 24 h.

VIII.7.2. Purificación y derivatización.

Los hidrolizados se filtraron y se pasaron por una columna Sep Pak. A continuación se derivatizó con fenilisotiocianato (PITC), siguiendo el método Pico-Tag (Waters).

VIII.7.3. Análisis por HPLC.

Los derivados feniltiocarbamilos de los aminoácidos se analizaron en un equipo Waters de HPLC con los siguientes

elementos: 2 bombas mod. 6000A, controlador de gradiente automatizado mod. 680, módulo de datos mod. 730, módulo de control de la temperatura de la columna, detector UV mod 440, columna Pico-Tag de acero (3.9 x 150 mm) y sistema de estabilización del eluente. La cuantificación se realizó con patrón externo que contenía los aminoácidos analizados.

... ..

IX. CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se ha estudiado ocho productos representativos elaborados a base de algas, comercializados en España con destino al consumo humano. El estudio se ha centrado en el análisis químico de los principales componentes de la biomasa constituyente de los preparados, y en la evaluación de los resultados obtenidos bajo la perspectiva de su uso como alimento. De este estudio pueden extraerse las siguientes conclusiones generales:

1. El análisis de la composición química general de los productos reveló la existencia de profundas diferencias entre los productos elaborados con macroalgas y los elaborados con microalgas. Estas diferencias también se observaron al profundizar en cada uno de los principios inmediatos de los productos. Esto conduce por tanto a diferencias en sus propiedades nutricionales. Los productos de macroalgas fueron más ricos en hidratos de carbono y minerales, mientras que los de microalgas presentaron mayor contenido de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y clorofila a.

2. El análisis de la materia mineral de los productos dió en general altos niveles de minerales, electrolitos y elementos traza, necesarios en la dieta humana, en comparación a otros alimentos vegetales. Fueron especialmente altos los contenidos en K, Mg, Fe, Cu, Mn, Co y Cr. Los productos "Wakame" y "Fucus" presentaron la relación Na/K más desfavorable.

3. Los productos "Dulce" y "Spirulina" presentaron un patron de azúcares neutros compatible con la predominancia de polisacáridos fácilmente absorbibles: xilano, almidón de florídeas y glucógeno. Este hecho aumenta la digestibilidad de la biomasa, lo cual constituye una ventaja con respecto a los otros productos.

4. La proporción de ácidos grasos esenciales frente a la de ácidos grasos saturados en la fracción lipídica de los productos fué superior a la proporción mínima recomendada en los alimentos en cinco de los ocho productos analizados. Todos los productos con Spirulina presentaron un alto contenido en ácido linolénico, por lo que pueden ser considerados como una buena fuente de este ácido graso esencial.

5. Los perfiles de aminoácidos obtenidos se asemejan en general a lo observado en la literatura para las especies de algas correspondientes. La proteína de los productos con Spirulina resultó ser de elevada calidad, comparada con el standard de la OMS y con otras fuentes de proteína.

6. Los productos analizados en el presente trabajo resultaron ser aptos para el consumo, en cuanto al contenido en humedad, de clorofila a, de ácidos nucleicos y de metales pesados. No obstante, se presentaron niveles relativamente altos de determinados metales pesados (Pb, Cd, Cu y Mn), que en algunos casos sobrepasaron los límites (aplicados en este trabajo de forma orientativa) establecidos en España para los productos de pesca. Las cantidades de producto necesarias para sobrepasar la ingesta diaria considerada tóxica por la Organización Mundial de la Salud excedían sin embargo a las correspondientes a un uso normal de estos productos.

7. Al margen de consideraciones como coste y aceptabilidad de estos productos, las características nutricionales y toxicológicas observadas en el presente estudio permiten afirmar que la introducción de los mismos en la dieta puede en general ser positiva. Aunque hay aspectos como el contenido en ácidos nucleicos o en metales pesados que pueden ser problemáticos en un consumo exclusivo de estos productos, este tipo de uso parece poco probable.

8. En algunos casos se observaron que determinadas características químicas de los productos, relevantes desde el punto de vista nutricional, diferían de las encontradas

previamente en poblaciones naturales o en estudios de laboratorio de las mismas o similares algas. En algunos casos esto era atribuible al mismo proceso de producción. Esto ocurrió, por ejemplo, con el relativo alto contenido en Na de dos de los productos de Spirulina analizados, y con la ausencia de los ácidos grasos poliinsaturados en el producto "Dulce" y de ácido linolénico en el producto "Chlorella". En otros casos, las diferencias eran atribuibles a la misma variabilidad biológica de las algas o de los ecosistemas de los que procedían. Por tanto, a la hora de diseñar el proceso de producción de algas destinadas al consumo humano es necesario considerar los factores que pueden afectar a sus propiedades nutricionales, siendo una pieza clave el análisis químico en profundidad del producto final cuando se persigue una determinada calidad nutricional en el mismo.

X. BIBLIOGRAFIA.

1. W.M. Farrow y B. Tabenkin (1966). Process for the preparation of lutein. U.S. Patent 3.280.502
2. W. Harvey (1988). Cracking open marine algae's biological treasure chest. *Biotechnology*, 6, 488.
3. V.J. Chapman y D.J. Chapman (1980). *Seaweeds and Their Uses*. 3ª Edición. Chapman and Hall, London.
4. T.C. Jennet, J.M. Hassett y J.E. Smith (1978). The use of algae to control heavy metals in the environment. *Min. Environ.*, 2, 26.
5. G.A. Rodgers, B. Bergman, E. Henriksson y M. Udris (1979). Utilisation of blue-green algae as biofertilisers. *Plant Soil*, 52, 99.
6. R.A. Wharton, D.T. Smernoff y M.M. Averner (1988). Algae in space. En C.A. Lembi y J.R. Waaland (eds.). *Algae and Human Affairs*. Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 485.
7. K. Ito y K. Hori (1989). Seaweed: chemical composition and potential food uses. *Food Rev. Int.*, 5, 101.
8. L.D. Druehl (1988). Cultivated edible kelp. En C.A. Lembi y J.R. Waaland (eds.). *Algae and Human Affairs*. Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 119.
9. H.A. Hoppe (1979). Marine algae and their products and constituents in pharmacy. En H.A. Hoppe, T. Levring e Y. Tanaka (eds.). *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter, Berlin. p. 25.
10. K.C. Morgan, J.L.C. Wright y F.J. Simpson (1980). Review of chemical constituents of the red alga Palmaria palmata (Dulse). *Econ. Bot.* 34, 27.
11. E. Strasburger, F. Noll, H. Schenck y A.F.W. Schimper (1981). *Tratado de Botánica*. 6ª Ed. Editorial Marín, Barcelona.
12. R. Biebl (1962). Seaweeds. En R.A. Lewin (ed.). *Physiology and Biochemistry of Algae*. Acad. Press, New York. p. 799.
13. H.C. Bold y M.J. Wynne (1985). *Introduction to the Algae. Structure and Reproduction*. 2ª Ed. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs.
14. T. Oh-hama y S. Miyachi (1988). Chlorella. En M.A. Borowizka y L.J. Borowitzka (eds.). *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 4.
15. P. Soong (1980). Production and development of Chlorella and Spirulina in Taiwan. En G. Shelef y C.J. Soeder (eds.). *Algae Biomass*. Elsevier, Amsterdam. p. 97.

16. A. Richmond (1988). Spirulina. En M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka (eds.). Micro-algal Biotechnology. Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 85.
17. O. Ciferri (1983). Spirulina, the edible microorganism. Microbiol. Rev., 47, 550.
18. R. Rippka, J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman y R.Y. Stanier (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol., 111, 1.
19. H. Durand-Chastel (1980). Production and use of Spirulina in Mexico. En G. Shelef y C.J. Soeder (eds.). Algae Biomass. Elsevier, Amsterdam. p. 50.
20. A. Jassby (1988). Spirulina: a model for microalgae as human food. En C.A. Lembi y J.R. Waaland (eds.). Algae and Human Affairs. Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 149.
21. L. Anderson, M.V. Dibble, H.S. Mitchell y H.J. Rynbergen (1972). Nutrición Humana. Principios y Aplicaciones. Ed. Bellaterra, S.A., Barcelona.
22. R. Perez, P. Durand, R. Kaas, O. Barbaroux, V. Barbier, C. Vinot, M. Bourgeay-Causse, M. Leclercq y J.Y. Moigne (1988). Undaria pinnatifida on the french coasts. Cultivation method. Biochemical composition of the sporophyte and the gametophyte. En T. Stadler et al. (eds.). Algal Biotechnology. Elsevier Appl. Sci. Pub., London. p. 315.
23. H.W. Milner (1953). The chemical composition of algae. En J.S. Burlew (ed.). Algal Culture- from Laboratory to Pilot Plant. Carnegie Inst., Washington. p. 285.
24. B.L. Moss (1948). Studies in the genus Fucus. I. On the structure and chemical composition of Fucus vesiculosus from three scottish localities. Ann. Bot., 12, 267.
25. W.A.P. Black (1949). Seasonal variation in chemical composition of some of the littoral seaweeds common to Scotland. Part II. Fucus serratus, Fucus vesiculosus, Fucus spiralis and Pelvetia caniculata. J. Soc. Chem. Ind., 68, 183.
26. E.W. Becker (1988). Micro-algae for human and animal consumption. En M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka (eds.). Microalgal Biotechnology. Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 222.
27. A. Jassby (1988). Some public health aspects of microalgal products. En C.A. Lembi y J.R. Waaland (eds.). Algae and Human Affairs. Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 181.
28. PAG ("Protein-Calorie Advisory Group") (1975). PAG ad hoc working group meeting on clinical evaluation and acceptable nucleic acid levels of SCP for human consumption. PAG Bull., 5, 17.

29. F.P. Healey (1973). Inorganic nutrient uptake and deficiency in algae. *Rev. Microbiol.*, 3, 69.
30. W. Wiessner (1962). Inorganic micronutrients. En R.A. Lewin (ed.). *Physiology and Biochemistry of Algae*. Acad. Press, New York. p. 267.
31. L.C. Rai, J.P. Gaur y H.D. Kumar (1981). Phycology and heavy-metal pollution. *Biol. Rev.*, 56, 99.
32. T. Yamamoto, Y. Otsuka y M. Okazaki (1979). The distribution of chemical elements in algae. En H.A. Hoppe, T. Levring e Y. Tanaka (eds.). *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter, Berlin. p. 569.
33. T. Yamamoto (1972). The relations between concentration factor in seaweeds and residence time of some elements in seawater. *Rec. Oceanogr. Wks. Japan*, 11, 65.
34. A.A. Fedorov y M.G. Pimenov (1967). Chemosystematics: problems and practical significance. Communication I. *Plant Resourc.*, 3, 3.
35. E.D. Goldberg, W.S. Broecker, M.G. Gross y K.K. Turekian (1971). Radioactivity in the Marine Environment. Committee on Oceanography, National Academy of Science, Washington D.C.
36. R.J. Livingston (1977). Review of current literature concerning the acute and chronic effects of pesticides on aquatic organisms. *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, 7, 325.
37. R. Margalef (1982). *Ecología*. Omega, Barcelona.
- 38 T. Tusibaki y K. Irukuyama (1977). *Minamata disease*. Kodansha Ltd., Tokyo.
39. H.G. Levine (1984). The use of seaweeds for monitoring coastal waters. En L.E. Shubert (ed.). *Algae as Ecological Indicators*. Academic Press, London. p. 189.
40. B.A. Whitton (1984). Algae as monitors of heavy metals in freshwaters. En L.E. Shubert (ed.). *Algae as Ecological Indicators*. Academic Press, London. p. 57.
41. Y. Tanaka y J. F. Stara (1979). Algal polysaccharides: their potential use to prevent chronic metal poisoning. En H.A. Hoppe, T. Levring e Y. Tanaka (eds.). *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter, Berlin. p. 525.
42. G.N. Seaenko, M.D. Koryakova, V.F. Makienko y I.G. Dobrosmyslova (1976). Concentration of polyvalent metals by seaweeds. *Mar. Biol.*, 34, 169.
43. S.K. Czarnecki y D. Kritchevsky (1980). Trace elements. En R.B. Alfin-Slater y D. Kritchevsky (eds.). *Nutrition and the Adult- Micronutrients*. Human Nutrition, vol. 3B. Plenum Press, New York. p. 319.

44. W. F. J. Cuthbertson (1989). What is a healthy food?. Food Chem., 33, 53.
45. Presidencia del Gobierno: Real Decreto 1521/1977 de 3 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria de los productos de la pesca con destino al consumo humano (BOE 2 de julio de 1977, no. 157).
46. R. Catala, R. Montoro y N. Ybañez (1983). Contaminación por metales pesados de los productos cárnicos. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 23, 202.
47. A. Monico, A. Marine y M. Xirau (1986). Impurezas de origen no natural en alimentos. Alimentaria, Jul.-Ag., 21.
48. P. Sanz y S. Nogué (1990). Intoxicación por metales de origen alimentario. Med. Clín., 94, 215.
49. J.J. Ortega Calvo y M. Ortega Calvo (1989). Efectos de los metales pesados, mercurio y plomo en el hombre. Med. Int., 6, 119.
50. N.T. Crosby (1977). Determination of metals in food. A review. Analyst, 102, 225.
51. D.A. Skoog y D.M. West (1984). Análisis instrumental. Ed. Interamericana, México.
52. G.J. Sharp, H.S. Samant y O.C. Vaidya (1988). Selected metal levels of commercially valuable seaweeds adjacent to and distant from point sources of contamination in Nova Scotia and New Brunswick. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 40, 724.
53. G.W. Bryan y L.G. Hummerstone (1973). Brown seaweed as an indicator of heavy metals in estuaries in South-west England. J. Mar. Biol. Ass., 53, 705.
54. H.A. Spoehr y H.W. Milner (1949). The chemical composition of Chlorella: effect of environmental conditions. Plant Physiol., 24, 120.
55. J.T. Trevors, G.W. Stratton y G.M. Gadd (1986). Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae, and fungi. Can. J. Microbiol., 32, 447.
56. U. Gerhards y H. Weller (1977). Die Aufnahme von Quecksilber, Cadmium und Nickel durch Chlorella pyrenoidosa. Z. Pflanzenphysiol. Bd., 82, 292.
57. Y.J. Shied y J. Barber (1973). Uptake of mercury by Chlorella and its effect on potassium regulation. Planta, 109, 49.
58. H.J. Geisweid y W. Urbach (1983). Sorption of cadmium by the green microalgae Chlorella vulgaris, Ankistrodesmus braunii and Eremosphaera viridis. Z. Pflanzenphysiol. Bd., 109, 127.

59. B.A. Hart y B.D. Scaife (1977). Toxicity and bioaccumulation of cadmium in Chlorella pyrenoidosa. Environ. Res., 14, 401.
60. A. Nakajima, T. Horikoshi y T. Sakaguchi (1981). Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XVII. Selective accumulation of heavy metal ions by Chlorella regularis. European. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 12, 76.
61. D. Khummongkol, G.S. Canterford y C. Fryer (1982). Accumulation of heavy metals in unicellular algae. Biotechnol. Bioeng., 24, 2643.
62. T. Sakaguchi, T. Tsuji, A. Nakajima y T. Horikoshi (1979). Accumulation of cadmium by green microalgae. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 8, 207.
63. E.W. Becker (1984). Biotechnology and exploitation of the green alga Scenedesmus obliquus in India. Biomass, 4, 1.
64. H.D. Payer, W. Pabst y K.H. Runkel (1980). Review of the nutritional and toxicological properties of the green alga Scenedesmus obliquus as a single cell protein. En G. Shelef y C.J. Soeder (eds.). Algae Biomass. Elsevier, Amsterdam. p. 786.
65. J. De la Noue, D. Proulx, R. Guay, Y. Pouliot y J. Turcotte (1986). Algal biomass production from wastewaters and swine manure: nutritional and safety aspects. En M. Mooyoung y H.F. Gregory (eds.). Microbial Biomass Proteins. Elsevier, Amsterdam. p. 140.
66. H.D. Payer y K.H. Runkel (1978). Environmental pollutants in freshwater algae from open-air mass cultures. Arch. Hydrobiol. Beih., 11, 184.
67. H.D. Payer, K.H. Runkel, P. Schramel, E. Stengel, A. Bhumiratan y C.J. Soeder (1976). Environmental influences on the accumulation of lead, cadmium, mercury, antimony, arsenic, selenium, bromine and tin in unicellular algae cultivated in Thailand and in Germany. Chemosphere, 6, 413.
68. S. Yannai, S. Mokadi, K. Sachs, B. Kantorowitz y Z. Berk (1980). Certain contaminants in algae and in animals fed algae-containing diets, and secondary toxicity of the algae. En G. Shelef y C.J. Soeder (eds.). Algae Biomass. Elsevier, Amsterdam. p. 757.
69. B. Laquerbe, F. Busson y M. Maigrot (1970). Sur la composition en éléments minéraux de deux cyanophycées, Spirulina platensis (Gom.) Geitler et S. geitleri J. de Toni. C.R. Acad. Sci. Paris, 270, 2130.
70. E.W. Becker y L.V. Venkataraman (1984). Production and utilization of the blue-green alga Spirulina in India. Biomass, 4, 105.

71. C. Santillan (1982). Mass production of Spirulina. *Experientia*, **38**, 40.
72. P.E. Johnson y L. E. Shubert (1986). Accumulation of mercury and other elements by Spirulina (Cyanophyceae). *Nutr. Rep. Int.*, **34**, 1063.
73. S. Mannino y T.G. Benelli (1980). Constituenti minerali di biomasse di Spirulina maxima. En R. Materassi (ed.). *Prospettive della Coltura di Spirulina in Italia*. CNR, Roma. p. 131.
74. E.W. Becker y L.V. Venkataraman (1982). *Biotechnology and Exploitation of Algae - the Indian Approach*. German Agency for Technical Cooperation, Eschborn.
75. H. Durand-Chastel (1982). General characteristics of blue-green algae (cyanobacteria): Spirulina. En O.R. Zaborsky (ed.). *CRC Handbook of Biosolar Resources*. CRC Press, Boca Raton. p. 19.
76. C. Boudene, E. Collas y C. Jenkins (1975). Recherche et dosage de divers toxiques minéraux dans les algues spirulines de différentes origines et évaluation de la toxicité a long terme chez le pat d'un lot d'algues spirulines de provenance mexicaine. *Ann. Nutr. Aliment.*, **29**, 577.
77. R.M. Barnes (1984). Determination of trace elements in biological materials by ICP. *ICP Inf. Newslett.*, **10**, 299.
78. V.A. Fassel (1986). Analytical inductively coupled plasma spectroscopies- past, present and future. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **324**, 511.
79. K.A. Wolnik, F.L. Fricke y R.W. Kuennen (1982). Trace elemental analysis of food. *ICP Inf. Newslett.*, **8**, 4.
80. N.G. Popovich (1982). Spirulina. *Amer. Pharm.*, **22**, 8.
81. W. F. Ganong (1984). *Fisiología Medica*. 9ª Ed. El Manual Moderno, México.
82. K.C. Hong y R.L. Cruess (1977). The effects of Undaria extracts on calcium and bone metabolism. *J. Phycol. (Suppl.)*, **13**, 31.
83. U. Prasomzup (1979). Effect of different levels of algal diets on rats. *Food*, **11**, 294.
84. L.K. Dahl (1972). Salt and hypertension. *Am. J. Clin. Nutr.*, **25**, 231.
85. I. Mcquarrie, W.M. Thompson y J.A. Anderson (1936). Effects of excessive ingestion of sodium and potassium salts on carbohydrate metabolism and blood pressure in diabetic children. *J. Nutr.*, **11**, 77.

86. J.N. Cohn (1977). Heart disease in hypertensive patient. *Med. Clin. North Am.*, **61**, 581.
87. G.R. Meneely y C.O.T. Ball (1958). Experimental epidemiology of chronic sodium chloride toxicity and protective effect of potassium chloride. *Am. J. Med.*, **25**, 713.
88. L.D. Dahl, G. Leitl y M. Heine (1972). Influence of dietary potassium and sodium/potassium molar ratios on the development of salt hypertension. *J. Exp. Med.*, **136**, 318.
89. A.E. Bender (1987). Use and safety of novel foods. En K. Miller (Ed.). *Toxicological Aspects of Food*. Elsevier Appl. Sci., Essex. p. 425.
90. P.E. Johnson and L.E. Shubert (1986). Availability of iron to rats from Spirulina, a blue-green alga. *Nutr. Res.*, **6**, 85.
91. J.C. Sherlock (1986). Cadmium in food and the diet. *Experientia*, **50**, 110.
92. B.J.D. Meeuse (1962). Storage products. En R.A. Lewin (ed.). *Physiology and Biochemistry of Algae*. Academic Press, New York. p. 289.
93. E. Percival (1979). The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. *Br. Phycol. J.*, **14**, 103.
94. B.Z. Siegel y S.M. Siegel (1973). The chemical composition of algal cell wall. *CRC. Crit. Rev.*, **3**, 1.
95. D.R. Kreger (1962). Cell walls. En: R.A. Lewin (ed.). *Physiology and Biochemistry of Algae*. Academic Press, New York. p. 315.
96. G. Drews y J. Weckesser (1982). Function, structure and composition of cell walls and external layers. En N.G. Carr y B.A. Whitton (ed.). *The Biology of Cyanobacteria*. Botanical Monographs, Vol 19. Blackwell, Oxford. p. 333.
97. P. Felig, R.J. Havel y L. H. Smith (1983). VI. Metabolismo y nutrición. En L.H. Smith y S.O. Thier (eds.). *Fisiopatología. Principios Biológicos de la Enfermedad*. Ed. Med. Panam., Buenos Aires. p. 384.
98. W.A.P. Black, E.T. Dewar y F.N. Woodward (1952). Manufacture of algal chemicals. IV.- Laboratory-scale isolation of fucoidin from brown marine algae. *J. Sci. Food Agric.*, **3**, 122.
99. M.G. Macpherson y E.G. Young (1952). Seasonal variation in the chemical composition of the fucaceae in the maritime provinces. *Can. J. Bot.*, **30**, 67.

100. B.L. Moss (1950). Studies in the genus Fucus. II. The anatomical structure and chemical composition of receptacles of Fucus vesiculosus from three contrasting habitats. *Ann. Bot.*, **14**, 395.
101. S.A. Olaitan y D.H. Northcote (1962). Polysaccharides of Chlorella pyrenoidosa. *Biochem. J.*, **82**, 509.
102. K.M. Shekharam, L.V. Venkataraman y P.V. Salimath (1987). Carbohydrate composition and characterization of two unusual sugars from the blue-green algae, Spirulina platensis. *Phytochemistry*, **26**, 2267.
103. H.W. Johnston (1966). The biological and economical importance of algae, Part 2. *Tuatara*, **14**, 30.
104. G. Hedenskog, L. Enebo, J. Vendloba y B. Prokes (1969). Investigation of some methods for increasing the digestibility in vitro of microalgae. *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 37.
105. C. Van Eykelenburg (1978). V. A glucan from the cell wall of the cyanobacterium Spirulina platensis. *Antonie van Leeuw.*, **44**, 321.
106. M. Quillet (1975). Recherche sur les substances glucidiques elaborés par les spirulines. *Ann. Nutr. Alim.*, **29**, 553.
107. B. Casu, A. Naggi y J.R. Vercellotti (1980). Polisaccaridi di riserva della Spirulina platensis: estrazione e caratterizzazione. En R. Materassi (ed.). *Prospettive della Coltura di Spirulina in Italia*. CNR, Roma. p. 145.
108. A.J. Smith (1982). Modes of cyanobacterial carbon metabolism. En N.G. Carr y B.A. Whitton (eds.). *The Biology of Cyanobacteria*. Botanical Monographs, vol. 19. Blackwell, Oxford. p. 47.
109. J.D.A. Miller (1962). Fats and steroids. En R.A. Lewin (ed.). *"Physiology and Biochemistry of Algae"*. Academic Press, New York. p. 357.
110. J.K. Volkman, S.W. Jeffrey, P.D. Nichols, G.I. Rogers y C.D. Garland (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **128**, 219.
111. R.B. Johns, P.O. Nicholas y G.J. Perry (1979). Fatty acid composition of ten marine algae from australian waters. *Phytochemistry*, **18**, 799.
112. K. Hayashi, S. Kida, K. Kato y H. Yamada (1974). Component fatty acids of acetone-soluble lipids of 17 species of marine benthic algae. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **40**, 609.

113. S. Sato (1975). Fatty acid composition of lipids in some species of marine algae. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **41**, 1177.
114. G.R. Jamieson y R.H. Reid (1972). The component fatty acids of some marine algal lipids. *Phytochemistry*, **11**, 1423.
115. C.N. Kenyon (1972). Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae. *J. Bact.*, **109**, 827.
116. C.N. Kenyon, R. Rippka y R.Y. Stanier (1972). Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* **83**, 216.
117. J.L. Hardwood (1988). Fatty acid metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, **39**, 101.
118. B.W. Nichols (1973). Lipid composition and metabolism. En N.G. Carr y B.A. Whitton (eds.). *The Biology of The Blue-Green Algae*. Blackwell Sci. Pub., Oxford. p.144.
119. M. Piorreck, K. Hinnerk, K.H. Baasch y P. Pohl (1984). Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, **23**, 207.
120. P. Pohl, T. Passig y H. Wagner (1971). Uber den Einfluss von anorganischen Stickstoff-Gehalt in der Nahrlosung auf die Fettsaure- Biosynthese in Grunalgen. *Phytochemistry*, **10**, 1505.
121. A. Ben-Amotz, T.G. Tornabene y W.H. Thomas (1985). Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.*, **21**, 72.
122. P. Pohl y H. Wagner (1972). Control of fatty acid and lipid biosynthesis in Euglena gracilis by ammonia, light and DCMU. *Z. Naturforsch.*, **27b**, 53.
123. P. Pohl y F. Zurheide (1979). Control of fatty acid and lipid formation in Baltic marine algae by environmental factors. En L.A. Appelquist y C. Lilje (eds.). *Advances in The Biochemistry and Physiology of Plant Lipids*. Elsevier, Amsterdam.
124. P. Pohl y F. Zurheide (1979). Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors. En H.A. Hoppe, T. Leving y Y. Tanaka (eds.). *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter, Berlin. p. 473.
125. M. Piorreck y P. Pohl (1984). Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids in green and blue-green algae during one growth phase. *Phytochemistry*, **23**, 217.
126. B.W. Nichols (1965). Light induced changes in the lipids of Chlorella vulgaris. *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 274.

127. S. Aaronson (1973). Effect of incubation temperature on the macromolecular and lipid content of the phytoflagellate Ochromonas danica. J. Phycol., 9, 111.
128. G. Dohler y G. Datz (1980). Effect of light on lipid and fatty acid composition of cyanobacteria, Anacystis nidulans (Synechococcus). Z. Pflanzenphysiol. Bd., 100, 427.
129. L. Tomaselli, L. Giovannetti, A. Sacchi y F. Bocci (1988). Effects of temperature on growth and biochemical composition in Spirulina platensis strain M2. En R. Stadler et al. (eds.). Algal Biotechnology. Elsevier, Amsterdam. p. 305.
130. G. J. Olson y L.O. Ingram (1975). Effects of temperature and nutritional changes on the fatty acids of Agmenellum quadruplicatum. J. Bacteriol., 124, 373.
131. L.A.Shermann (1978). Differences in photosynthesis-associated properties of the blue-green alga Synechococcus cedrorum grown at 30 and 40 °C. J. Phycol., 14, 427.
132. R.G. Ackman, C.S. Tocher y J. Maclachlan (1968). Marine phytoplankter fatty acids. J. Fish. Res. Board Can., 225, 1603.
133. Z. Cohen, A. Vonshak y A. Richmond (1987). Fatty acid composition of Spirulina strains grown under various environments. Phytochemistry, 26, 2255.
134. R.G. Goodloe y R.J. Light (1982). Structure and composition of hydrocarbons and fatty acids from a marine blue-green alga, Synechococcus. Biochim. Biophys. Acta, 710, 485.
135. T.A.B. Sanders (1988). Essential and trans-fatty acids in nutrition. Nutrit. Res. Rev., 1, 57.
136. A. L. Lehninger (1981). Bioquímica. Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular. 2ª Ed. Omega, Barcelona.
137. J.E. Pike (1971). Prostaglandins. Science, 225, 84.
138. Y.S. Huang, M.S. Manku y D.F. Horrobin (1984). The effects of dietary cholesterol on blood and liver polyunsaturated fatty acids and on plasma cholesterol in rats fed various types of fatty acid diet. Lipids, 19, 664.
139. B.W. Nichols y R.S. Appleby (1969). The distribution and biosynthesis of arachidonic acid in algae. Phytochemistry, 8, 1907.
140. B.W. Nichols y B.J. Wood (1968). The occurrence and biosynthesis of gamma-linolenic acid in a blue-green alga, Spirulina. Lipids, 3, 46.

141. Z. Cohen (1986). Products from microalgae. En A. Richmond (ed.). CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton. p. 421.
142. T.J. Ahern, S. Kato y E. Sada (1983). Arachidonic acid production by the red alga Porphyridium cruentum. Biotechnol. Bioeng., 25, 1057.
143. R.P. Gregson, J.F. Marwood y R.J. Quinn (1979). The occurrence of prostaglandins PGE-2 and PGE-2alpha in a plant-like red alga Gracilaria lichenoides. Tetrahedron Lett., 46, 4505.
144. A. Seto, H.L. Wang y C.W. Hesseltine (1984). Culture conditions affect eicosapentanoic acid content of Chlorella minutissima. J. Am. Oil Chem. Soc., 61, 892.
145. S. Araki, T. Sakurai y T. Omata (1986). Lipid and fatty acid composition in the red alga Porphyra yezoensis. Jap. J. Phycol., 34, 94.
146. M. Kayama, J. Imayoshi, S. Araki, H. Ogawa, T. Oohusa, T. Ueno y M. Saito (1983). Changes in lipids of the dried laver, "Nori" at different water activities. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 49, 787.
147. D. Kyle (1989). Market applications for microalgae. J. Am. Oil Chem. Soc., 66, 648.
148. J. Han, E.D. McCarthy, W. Van Hoeven, M. Calvin y W.H. Bradley (1968). Organic geochemical studies. II. A preliminary report on the distribution of aliphatic hydrocarbons in algae, in bacteria and in recent lake sediment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 59, 29.
149. E. Gelpi, H. Schneider, J. Mann y J. Oro (1970). Hydrocarbons of geochemical significance in microscopic algae. Phytochemistry, 9, 603.
150. C. Paoletti, B. Pushparaj, G. Florenzano, P. Capella y G. Lercker (1976). Unsaponifiable matter of green and blue-green algal lipids as a factor of biochemical differentiation of their biomasses: I. Total unsaponifiable and hydrocarbon fraction. Lipids, 11, 258.
151. M.A. Borowitzka (1988). Fats, oils and hydrocarbons. En M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka (eds.). Micro-algal Biotechnology. Cambr. Univ. Press, Cambridge. p. 257.
152. P. Pohl, H. Wagner y T. Passig (1968). Inhaltsstoffe von Algen -II. Uber die Unterschiedliche Fettsaurezusammensetzung von Salz und Susswasser-algen. Phytochemistry, 7, 1565.
153. T. Takagi, M. Asahi y Y. Itabashi (1985). Fatty acid composition of twelve algae from Japanese waters. J. Japan Oil Chem. Soc., 34, 12.

154. H. Schneider, E. Gelpi, E.O. Bennett y J. Oro (1970). Fatty acids of geochemical significance in microscopic algae. *Phytochemistry*, 9, 613.
155. R. Materassi, C. Paoletti, W. Balloni y G. Florenzano (1980). Some considerations on the production of lipid substances by microalgae and cyanobacteria. En G. Shelef y C.J. Soeder (eds.). *Algae Biomass*. Elsevier, Amsterdam. p. 619.
156. R. C. Clark, Jr., y M. Blumer (1967). Distribution of n-paraffins in marine organisms and sediments. *Limnol. Oceanog.*, 12, 79.
157. W.W. Youngblood, M. Blumer, R.L. Guillard y F. Fiore (1971). Saturated and unsaturated hydrocarbons in marine benthic algae. *Mar. Biol.*, 8, 190.
158. H.W. Milner (1948). The fatty acids of Chlorella. *J. Biol. Chem.*, 176, 813.
159. M. Matucha, L. Zilka y K. Svihel (1972). Gas chromatographic analysis of the higher fatty acids of the alga Chlorella vulgaris (pyrenoïdosa). *J. Chrom.*, 65, 371.
160. M. Podojil, K. Livanski, B. Prokes y M. Wurst (1978). Fatty acids in green algae cultivated on a pilot-plant scale. *Folia Microbiol.*, 23, 444.
161. T. Rezanka y M. Podojil (1984). The very long chain fatty acids of the green alga, Chlorella kessleri. *Lipids*, 19, 472.
162. G. Dickson, R.A. Galloway y G.W. Patterson (1969). Environmentally induced changes in the fatty acids of Chlorella. *Plant Physiol.*, 44, 1413.
163. T. Rezanka, J. Zahradnik y M. Podojil (1982). Hydrocarbons in green and blue-green algae. *Folia Microbiol.*, 27, 450.
164. G.W. Patterson (1967). The effect of culture conditions on the hydrocarbon content of Chlorella vulgaris. *J. Phycol.*, 3, 22.
165. A. Oren, A. Fatton, E. Padan y A. Tietz (1985). Unsaturated fatty acid composition and biosynthesis in Oscillatoria limnetica and other cyanobacteria. *Arch Microbiol.*, 141, 138.
166. B.J.F. Hudson e I.G. Karis (1974). The lipids of the alga Spirulina. *J. Sci. Fd. Agric.*, 25, 759.
167. C. H. Lea (1962). The oxidative deterioration of food lipids. En H.W. Schultz (ed.). *Lipids and their Oxidation*. Avi Pub. Co., Westport. p. 3.

168. M.A. Diab, M. Podojil, M. Wurst y B. Prokes (1976). Content of fatty acids of Chlorella kessleri in a deep tank fermentation. *Folia Microbiol.*, **21**, 294.
169. J. Erwin y K. Bloch (1963). Polyunsaturated fatty acids in some microorganisms. *Biochem. Z.*, **338**, 496.
170. A. Richmond (1986). Microalgae of economic potential. En A. Richmond (ed.). *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton. p. 199.
171. L.O. Lundberg (1954). Autoxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 523.
172. R. Usuki (1989). Oxidative deterioration of commercial fried foods containing chlorophylls. *J. Jap. Soc. Food Sci. Tech.*, **36**, 475.
173. A. Vonshak y A. Richmond (1988). Mass production of the blue-green alga Spirulina: an overview. *Biomass*, **15**, 233.
174. A. Richmond y A. Vonshak (1986). Management of Spirulina in mass culture. En W.R. Borday y R.P. Mc. Intosh (eds.). *Algal Biomass Technologies*. J. Cramer. Gebruder Borntraeger, Berlin. p. 222.
175. A. Vonshak, S. Boussiba, A. Abeliovich y A. Richmond (1983). Production of Spirulina biomass: maintenance of monoalgal culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 341.
176. S.G. Wakeham y E.A. Canuel (1988). Organic geochemistry of particulate matter in the eastern tropical Pacific Ocean: Implications for particle dynamics. *J. Mar. Research*, **46**, 183.
177. L. Fowden (1962). Amino acids and proteins. En R.A. Lewin (ed.). *Physiology and Biochemistry of Algae*. Acad. Press, New York. p. 189.
178. I.M. Munda y F. Gubensek (1976). The amino acid composition of some common marine algae from Iceland. *Bot. Mar.*, **19**, 85.
179. M.G. Guerrero (1986). Photoproduction of microalgal biomass. En S. Terol (ed.). *Proceedings of the 1986 International Congress on Renewable Energy Sources*. Vol. I. CSIC, Madrid. p. 70.
180. G. Torcillo, B. Pushparaj, F. Bocci, W. Balloni, R. Materassi y G. Florenzano (1986). Production of Spirulina biomass in closed photobioreactors. *Biomass*, **11**, 61.
181. C. Paoletti, M. Vincenzini, F. Bocci y R. Materassi (1980). Composizione biochimica generale delle biomasse di Spirulina platensis e S. maxima. En R. Materassi (ed.). *Prospettive della Coltura di Spirulina in Italia*. CNR, Roma. p. 111.

182. J.F. Wu y W.G. Pond (1981). Amino acid composition and microbial contamination of Spirulina maxima, a blue-green alga, grown on the effluent of different fermented animal wastes. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 27, 151.
183. G. Clément, C. Giddey y R. Menzi (1967). Amino acid composition and nutritive value of the alga Spirulina maxima. J. Sci. Food Agric., 18, 497.
184. O. Ciferri y O. Tiboni (1985). The biochemistry and industrial potential of Spirulina. Ann. Rev. Microbiol., 39, 503.
185. K. Nehring (1960). Agrikulturchemische Untersuchungsmethoden für Dünge- und Futtermittel, Boden und Milch: Bestimmung des Gesamtstickstoffs, Methode von O. Foerster. Verlag Paul Parey, Hamburg.
186. M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28, 350
187. N. Zoellner y K. Kirsch (1962). Microdetermination of lipids by the sulfophosphovanillin reaction. Z. Ges. Exp. Med., 135, 545.
188. R.M. Smillie y G. Krotkov (1960). The estimation of nucleic acids in some algae and higher plants. Can. J. Bot., 38, 31.
189. N.R. Mc Quacker, D.F. Brown y P.D. Kluckner (1979). Digestion of environmental materials for analysis by inductively coupled plasma- atomic emission spectrometry. Anal. Chem., 51, 1082.
190. C.I.I. (1969). Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Agron. Trop., 24, 827.
191. M. Pinta (1973). Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Cu par absorption atomique. Oleaginous, 28, 87.
192. R.L. Dalquist y J.W. Knoll (1978). Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry: analysis of biological materials and soils for major, trace and ultratrace elements. Appl. Spectr., 32, 1.
193. D.J. Lyons, K.P. Spann y R.L. Roofayel (1985). Determination of total calcium, zinc, manganese, iron, magnesium and phosphorus in animal feeds and plant material using inductively coupled plasma emission spectrometry. Analyst, 110, 955.
194. R.K. Winge, V.J. Peterson y V.A. Fassel (1979). Inductively coupled plasma- atomic emission spectroscopy: prominent lines. Appl. Spectr., 33, 206.

195. M.E.C. Moers (1989). Occurrence and Fate of Carbohydrates in Recent and Ancient Sediments from Different Environments of Deposition. Tesis Doctoral, Universidad Técnica de Delft, Holanda.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes

en el día de la fecha, para juzgar el Tesis Doctoral de
Jose Julia Ortega Calvo
de la Especialidad de Evaluación Nutricional y Toxicológica
de Algas Comestibles: Composición Química

- APTO cum laude, por

unanimidad -
20

El Vocal,
Juan de Vega

El Presidente,
M. I. de la Cruz

El Vocal,
Julia
El Secretario,
A. H.

1091
El Vocal,
Thoulezpama
El Doctorado,

Julia Ortega Calvo



500594966

FBI E TD-236

594966