



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

CARACTERIZACIÓN Y USO DE ALGAS PARA LA FABRICACIÓN DE FILMS COMESTIBLES, Y SU POSTERIOR ESTUDIO PARA USO EN ALIMENTACIÓN

Autor: Marina Burón Fernández.

Tutores: Lucía Citores González (UVA)

Ana Belén Martín Diana (ITACyL)

Daniel Rico Bargués (ITACyL)

ÍNDICE DE CONTENIDOS:

(I)	Resumen	4
(II)	Abstract	4
(III)	Abreviaturas	5
(IV)	Índice de imágenes, tablas y figuras	5
1.	Introducción	
1.1.	Productos piscícolas y su vida útil	7
1.1.1.	Trucha	8
1.2.	Tecnologías enfocadas a la conservación de alimentos	8
1.3.	Valorización de algas y otros subproductos	9
1.4.	Uso de recubrimientos en alimentación	10
1.5.	Antioxidantes y reacciones de oxidación en alimentos	11
1.5.1.	Métodos para medir el poder antioxidante en alimentos	12
1.5.1.1.	Determinación de fenoles totales.....	12
1.5.1.2.	TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	12
1.5.1.3.	ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	13
1.5.1.4.	FRAP (Ferric Reducing Activity Power)	13
1.5.1.5.	Capacidad antioxidante frente al radical DPPH	13
1.5.2.	Oxidación de lípidos	14
1.5.3.	Oxidación de proteínas	15
1.6.	Aspectos legislativos	16
1.7.	Alimentos funcionales.....	17
2.	Objetivos	18
3.	Materiales y métodos	
3.1.	MATERIALES.....	19
3.1.1.	Reactivos químicos	19
3.1.2.	Materiales biológicos	19
3.1.2.1.	Algas	19
3.1.2.2.	Truchas	20
3.2.	MÉTODOS	21
3.2.1.	Elaboración de films de quitosano, algas y extractos de algas	21
3.2.1.1.	Preparación de extractos.....	21
3.2.1.2.	Estudio de capacidad antioxidante de los extractos.	22
3.2.1.2.1.	Determinación de fenoles totales	22
3.2.1.2.2.	TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)	22
3.2.1.2.3.	ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	23
3.2.1.2.4.	FRAP (Ferric Reducing Activity Power).....	24

3.2.1.3.	Preparación y acondicionamiento de los films	24
3.2.2.	Determinación de la capacidad antioxidante de los films	25
3.2.2.1.	Extracciones de los films	25
3.2.2.1.1.	TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	25
3.2.2.1.2.	ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	26
3.2.3.	Estudio del efecto de los films sobre la vida útil del pescado....	26
3.2.3.1.	Preparación de las muestras	26
3.2.3.2.	Actividad antimicrobiana.....	27
3.2.3.3.	pH	27
3.2.3.4.	Actividad del agua	27
3.2.3.5.	Estudio del color.....	28
3.2.3.6.	Determinación de la oxidación lipídica (TBARS).....	28
3.2.3.7.	Determinación de la oxidación proteica (Carbonilos)29	
3.2.3.8.	Extracciones de la muestra para realizar el estudio del poder antioxidante	29
3.2.3.8.1.	TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	30
3.2.3.8.2.	ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	30
3.2.3.8.3.	Ensayo de la capacidad oxidante frente al radical DPPH	30
3.2.4.	Análisis estadístico.....	31

4. Resultados y discusión

4.1.	Análisis de la capacidad antioxidante de las algas	32
4.2.	Determinación de la capacidad antioxidante de los recubrimientos	35
4.3.	Estudio del efecto conservador de los films en la vida útil del pescado ...	37
4.3.1.	Actividad antimicrobiana	37
4.3.2.	pH.....	39
4.3.3.	Actividad de agua.....	42
4.3.4.	Estudio del color.....	43
4.3.5.	Determinación de la oxidación lipídica	46
4.3.6.	Determinación de la oxidación proteica.....	47
4.3.7.	Estudio del poder antioxidante	48

5. Conclusiones

(V)	Referencias bibliográficas.....	54
(VI)	Referencias web.....	56

(I) RESUMEN:

La última década ha supuesto un giro en el panorama de la industria alimentaria hacia una "alimentación como fuente de salud". Esta premisa era hasta hace unos años el pilar de la alimentación ecológica y ahora se ve afectada por una gran variedad de nuevos productos sanos y saludables. En la actualidad ha aumentado el consumo de estos alimentos dando como resultado la revalorización de las materias primas ecológicas útiles para generar este tipo de productos. Por otra parte, se están desarrollando nuevas líneas de investigación para dar soluciones alternativas a la conservación de alimentos. En este sentido, la tecnología de los recubrimientos comestibles surge como una alternativa prometedora para la mejora de la calidad y conservación de alimentos durante su procesado y/o almacenamiento. La incorporación de estos recubrimientos supone trabajar con materias biodegradables y respetuosas con el medio ambiente, y se propone como un método para mejorar la eficacia y/o abaratar costes.

Puesto que el pescado tiene una vida útil muy baja, asociada a diversos factores, el presente trabajo hace un estudio del uso de recubrimientos formulados con productos naturales, algas; sobre hamburguesas de trucha para estudiar el aumento de su vida útil a través de diferentes métodos de análisis. Los resultados obtenidos indican que la incorporación de estos recubrimientos de algas aumenta la vida útil y la actividad antioxidante de la carne de pescado. Por tanto, el producto desarrollado es un alimento potencialmente funcional elaborado con algas, una materia prima renovable y muy saludable.

(II) ABSTRACT:

In the last decade there has been a shift in the perception of the food industry to a "health food source." This premise was until recently the mainstay of organic food and now is affected by a variety of new safe and healthy products. Nowadays, the consumption of these kinds of foods has increased giving as a result a reevaluation of ecological raw materials useful for the generation of these products. On the other hand, new research lines are being developed to provide alternative solutions to food preservation. In this sense, technology of edible coatings arises as a hopeful alternative to improve the quality and preservation of food during processing and / or storage. The incorporation of these coatings involves working with biodegradable materials respectful with the environment, and it is proposed as a method for improving the efficacy and / or reducing costs.

Since the fish has a very low shelf life due to several factors, this paper presents a research study of the use of coatings formulated with seaweeds, applied to trout burgers to study, through different analyses, the increase in their shelf life. The results indicate that the incorporation of these coatings increases shelf life and antioxidant activity of the fish meat. Therefore the developed product is a potentially functional food made from seaweeds, a very healthy and renewable raw material.

(III) Abreviaturas utilizadas:

HPP: High Pressure Processing (Proceso de conservación de alimentos de alta presión)

ROS: Reactive Oxygen Species (Especies reactivas del oxígeno)

TROLOX: Ácido (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotioazolin-6-sulfónico)

AAPH: 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro

TCA: Ácido tricloroacético

TBA: Ácido tiobarbitúrico

MDA: Malondialdehído

DNPH: 2,4-Dinitrofenilhidracina

TBS: Tris-buffered saline

BHT: Butilhidroxitolueno

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

(IV) Índice de imágenes, tablas y figuras:

Imagen 1: Trucha arco iris.

Imagen 2: Neutralización del radical libre por un antioxidante.

Imagen 3: Estructura química del ABTS proyectada.

Imagen 4: Reacción entre el radical DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidracil) y la especie antioxidante.

Imagen 5: Mecanismos de oxidación de lípidos.

Imagen 6: a) Alga Dulse, b) Espagueti de mar

Imagen 7: a) Film de quitosano, b) Film de alga Espagueti de mar, c) Film de alga Dulse, d) Film de extracto de alga Espagueti de mar y e) Film de extracto de alga Dulse

Figura 1: Variación del contenido de fenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/gramo de muestra) de las algas Dulse (D) y Espagueti de mar (E)

Figura 2: Estudio del poder reductor de las algas Dulce (D) y Espagueti de mar (E).

Figura 3: ORAC de las algas Dulce (D) y espagueti de mar (E).

Figura 4: TEAC de las algas Dulce (D) y Espagueti de mar (E).

Figura 5: ORAC de los diferentes tratamientos dados a las muestras: Recubrimiento de algas Dulce (D), Espagueti de mar (E), extracto de Dulce (ED), extracto de Espagueti de mar (EE) y quitosano (Q).

Figura 6: TEAC de los diferentes tratamientos dados a las muestras: Recubrimiento de algas Dulce (D), Espagueti de mar (E), extracto de Dulce (ED), extracto de Espagueti de mar (EE) y quitosano (Q).

Figura 7: Crecimiento de organismos psicrófilos, en log N (ufc/g); a lo largo de los días de almacenamiento.

Figura 8: Crecimiento de organismos mesófilos, en log N (ufc/g); a lo largo de los días de almacenamiento.

Figura 9: pH en función del día de análisis.

Figura 10: pH en función del día de almacenamiento y el tratamiento que se le da a las muestras. Recubrimiento de algas Dulce (D), Espagueti de mar (E), extracto de Dulce (ED), extracto de Espagueti de mar (EE) y quitosano (Q).

Figura 11: Actividad de agua en las diferentes muestras durante los diferentes días de análisis.

Figura 12: Color. Luminosidad en las diferentes muestras durante los días de análisis.

Figura 13: Color. Coordenadas a y b en el día 0.

Figura 14: Color. Coordenadas a y b en el día 7.

Figura 15: TBARS. Aumento de la oxidación lipídica con los días de almacenamiento

Figura 16: Representación de la oxidación proteica mediante el contenido en carbonilos durante los diferentes días de almacenamiento.

Figura 17: ORAC de las muestras con los diferentes recubrimientos: control (C), Recubrimiento de algas Dulce (D), Espagueti de mar (E), extracto de Dulce (ED), extracto de Espagueti de mar (EE) y quitosano (Q).

Figura 18: TEAC de las muestras con diferentes recubrimientos: control (C), Recubrimiento de algas Dulce (D), Espagueti de mar (E), extracto de Dulce (ED), extracto de Espagueti de mar (EE) y quitosano (Q).

Tabla 1: Aditivos autorizados por la Directiva 2001/5/CE.

Tabla 2: Reactivos químicos utilizados.

Tabla 3: ANOVA del pH de las muestras de hamburguesas de pescado.

Tabla 4: pH de todas las muestras en los diferentes días de análisis. En el día cero se estudia sólo una muestra que incluye todos los tratamientos.

Tabla 5: ANOVA de la actividad de agua de las muestras.

Tabla 6: DPPH de las muestras con y sin film expresado en % de inhibición.

1. INTRODUCCION:

1.1. Productos piscícolas y su vida útil:

El pescado constituye uno de los pilares de nuestra dieta. Desde hace varias décadas se ha valorado como uno de los integrantes principales de la dieta mediterránea y, en consecuencia, su consumo ha sido recomendado por los especialistas.

Los pescados en general tienen un contenido calórico bajo, son fuente de proteínas de alto valor biológico, aportan vitaminas hidrosolubles y liposolubles y algunos minerales. Los hidratos de carbono en pescados son muy poco abundantes (siendo más significativos en algunos moluscos con concha como ostras y mejillones). El principal responsable del alto valor energético del pescado es su contenido en grasa, que es rica en ácidos grasos poliinsaturados, particularmente ácidos grasos omega 3, que es un ácido graso esencial debido a que nuestro organismo es incapaz de fabricarlo y tiene que ser ingerido en la dieta. (Los ácidos grasos esenciales están implicados en la maduración y en el crecimiento cerebral, entre otras cosas). Además el pescado fresco es una fuente de potasio. Esto se resume diciendo que el valor nutritivo del pescado es alto comparado con el de la carne (Villarino et al., 1999).

El pescado es un producto muy vulnerable que se degrada con gran rapidez y por ello se debe prestar especial cuidado a la hora de almacenarlo, sobre todo si este ya ha sido procesado (pelado, cortado o fileteado). La posible flora bacteriana contaminante es variada pero prevalecen géneros como *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Proteus*, etc. Muchas de estas variedades son psicrófilas (resistentes al frío) y la refrigeración retrasa el proceso de proliferación bacteriana y deterioro pero no lo inhibe totalmente, pues varios de estos microorganismos pueden desarrollarse a temperaturas de refrigeración. Normalmente el deterioro del pescado se incrementa debido a la poca acidez de su carne y a la presencia de la flora bacteriana que hace que se descomponga liberándose sustancias como la trimetilamina, amoníaco, mercaptanos, etc. La oxidación de las grasas también se debe tener en cuenta pues las enzimas lipasas que colaboran en la oxidación permanecen activas a temperatura de congelación.

El seguimiento de las técnicas de conservación del pescado y de manipulación va a condicionar sus propiedades organolépticas y los posibles riesgos para la salud del consumidor. Dada su importancia, se está investigando la utilización de tratamientos no térmicos para mantener las propiedades nutricionales, evitar su descomposición y los problemas oxidativos, y alargar la vida útil del pescado. El uso de tecnologías no térmicas como HPP (altas presiones) o recubrimientos tienen importancia.

1.1.1. Trucha:

Bajo este nombre se identifican todas las diferentes especies del género *Salmo*, el mismo que el salmón. Hay especies de agua dulce y de agua salada. Su aspecto externo presenta una coloración verde azulada y oscura en el dorso, con los lados más claros y el vientre blanquecino. Presenta manchas negras de pequeño tamaño en el dorso.

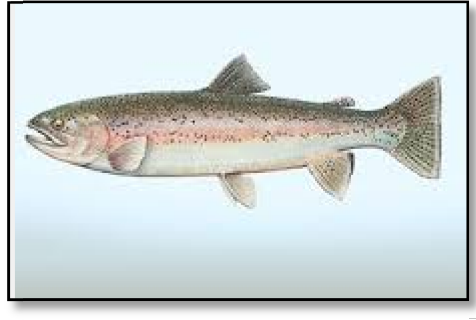


Imagen 1: trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss)

La trucha es un pescado semigraso que solo aporta 3 gramos de grasa por 100 gramos de carne. Se considera un pescado muy nutritivo con un aporte elevado de potasio para el correcto funcionamiento del sistema nervioso y la actividad muscular, fósforo presente en dientes y huesos, y moderado de sodio, magnesio, para el correcto funcionamiento del intestino, nervios y músculos; hierro y zinc. También posee vitamina B, para el correcto aprovechamiento de los nutrientes energéticos; vitamina A, que acumula en su hígado y músculo y que favorece la resistencia frente a las infecciones, y proteínas, que favorecen el crecimiento y desarrollo del organismo.

Composición	Trucha
Agua	73.1%
Proteínas	19.6%
Lípidos	5.6%
Carbohidratos	0.5%
Sustancias inorgánicas	1.2%

Tabla 1: Composición de la trucha. (Senser y Scherz, 1999).

1.2. Tecnologías enfocadas a la conservación de alimentos:

Para controlar la degradación de estos productos alimenticios se pueden utilizar diferentes técnicas como son:

- La tecnología de altas presiones hidrostáticas (High Pressure Processing-HPP) que mejora la seguridad y alarga la vida útil de los alimentos sin necesidad de añadir aditivos porque inactiva microorganismos y enzimas endógenas. Esta técnica se basa en que la elevada presión hidrostática tiene efectos de esterilización parcial obteniéndose productos de óptima calidad microbiológica con pocas modificaciones en aroma, sabor, y valor nutritivo. Por otro lado, esta técnica requiere largos tiempos de tratamiento para conseguir inactivar ciertos microorganismos patógenos (Gayán et al., 2012).
- Los tratamientos no térmicos de conservación tienen también la finalidad de conseguir productos más sanos con mayor vida útil y entre estos se incluyen los pulsos eléctricos que se basan en la exposición del alimento a un campo eléctrico para lograr la muerte de microorganismos por destrucción de la membrana celular. (García-Casal, 2007).
- El uso de recubrimientos en alimentos pretende ser un factor adicional para la conservación de alimentos. Con ellos se pretende controlar la humedad, gases y la migración de los lípidos. Pueden aportar aditivos y nutrientes. (Campos et al., 2010).

1.3. Valorización de algas y otros subproductos:

Se estima que la generación de residuos animales y vegetales en la Unión Europea es de alrededor de 89 millones de toneladas por año (EUROSTAT, 2010), los cuales llevan asociados unos elevados costes de gestión y eliminación. La industria agroalimentaria produce un alto contenido de estos residuos. Muchos de ellos son de gran interés agroindustrial y, por tanto tienen potencial para ser revalorizados. Además de ser reutilizables como materia para adicionar en piensos o fertilizantes, muchos de estos residuos contienen un perfil nutricional y bioactivo que los hace muy interesantes como alternativa a los aditivos sintéticos convencionales.

Las algas, pese a que su uso culinario se ha extendido durante los últimos años, su valorización se investiga por su gran potencial. En general las algas que van a ser utilizadas en alimentación son sometidas a procesos de conservación por secado mediante sol y aire, troceado y almacenaje en envases herméticos. Así son conservadas durante años sin alterar sus propiedades.

La mayor parte de las algas recolectadas en Europa se emplean para la extracción de ficocoloides. Estos ficocoloides son polisacáridos componentes de la pared celular y que sirven de soporte y protección a las algas. Se emplean en la industria farmacéutica y alimentaria como agentes gelificantes, espesantes y estabilizantes que constituyen los aditivos E-406, E-401, E-402, E-403 Y E-404.

Entre los beneficios de estos productos naturales destacan: la conveniencia del uso de estos desde el punto de vista dietético, son ricas en minerales y oligoelementos que absorben del mar. El calcio y el hierro tienden a acumularse en mayores niveles en algas que en plantas terrestres. Las algas también proporcionan grandes

cantidades de yodo que es esencial para el funcionamiento del tiroides (no obstante, hay establecidos unos límites máximos seguros para los productos de la Unión Europea que las contienen). También son ricas en fibras solubles como alginatos, la carragenina y el agar que contribuyen a aumentar la sensación de saciedad.

Además, las algas constituyen una fuente de polifenoles, y por tanto elevada capacidad antioxidante.

Los residuos de crustáceos y moluscos también son interesantes puesto que generan polisacáridos de alto valor tales como la quitina y el quitosano. El quitosano es un polisacárido lineal compuesto por cadenas aleatorias de β -(1-4) D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. El quitosano se produce mediante desacetilación de la quitina, que es un elemento estructural en el exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos, gambas, langostas etc.), también se encuentra en insectos y en las paredes celulares de hongos. Ha sido utilizado en alimentación debido a su biodegradabilidad y a su actividad antioxidante y antimicrobiana, y además no es tóxico. Es permeable a los gases CO₂ y O₂ y tiene buenas propiedades mecánicas.

Por todas estas razones existe un creciente interés en la valorización de subproductos alimentarios para, a partir de fuentes naturales, obtener componentes bioactivos y así además reducir el impacto medioambiental.

1.4. Uso de recubrimientos en alimentación:

Un recubrimiento comestible es una película que envuelve al alimento y que puede ser consumida como parte del mismo (Pastor, 2005), y cuya función es mantener la calidad de los productos recubiertos retrasando las principales causas de alteración a través de diferentes mecanismos (Kester et al., 1986, Debeaufort et al., 1998). Se ha estudiado ya el uso de recubrimientos en alimentación, para conservar las características del alimento y alargar su vida útil (Hosseini et al., 2008; Ruiz-Navajas et al., 2013; Maftoonazad et al., 2009; Ojagh et al., 2011)

Estos recubrimientos evitan la ganancia o pérdida de humedad, que puede provocar una modificación de la textura, turgencia, etc. Ralentizan los cambios químicos que pueden afectar al color, aroma o valor nutricional del alimento, actúan como barrera al intercambio de gases que puede influir en gran medida en la estabilidad de los alimentos sensibles a la oxidación de lípidos, vitaminas y pigmentos, y mejoran la estabilidad microbiológica (Sánchez-Gonzalez et al., 2011).

La adición de las algas y quitosano a los recubrimientos supone un estudio viable puesto que se trata de una materia prima abundante y renovable, además de funcionar como barrera selectiva para la transferencia de gases y humedad, ralentizan el proceso de descomposición del alimento, evitan la oxidación y pérdida de compuestos y evita el crecimiento de bacterias. Además es una fuente de origen natural, biodegradable y por tanto respetuosa con el medio ambiente (Hosseini et al., 2009).

1.5. Antioxidantes y reacciones de oxidación en alimentos.

Los antioxidantes son moléculas que tienen la propiedad de reducir la oxidación de otras moléculas. A veces, durante el transcurso de estas reacciones, se pueden producir radicales libres, que son especies muy oxidativas que en el organismo pueden causar daños. Los antioxidantes son especies capaces de reaccionar con el radical libre cediéndole un electrón, actuando como inhibidores de algún producto intermedio y oxidándose ellos mismos. La oxidación causada por los radicales libres reduce la capacidad de combatir el envejecimiento y enfermedades asociadas al mismo (Jirovetz et al., 2006).

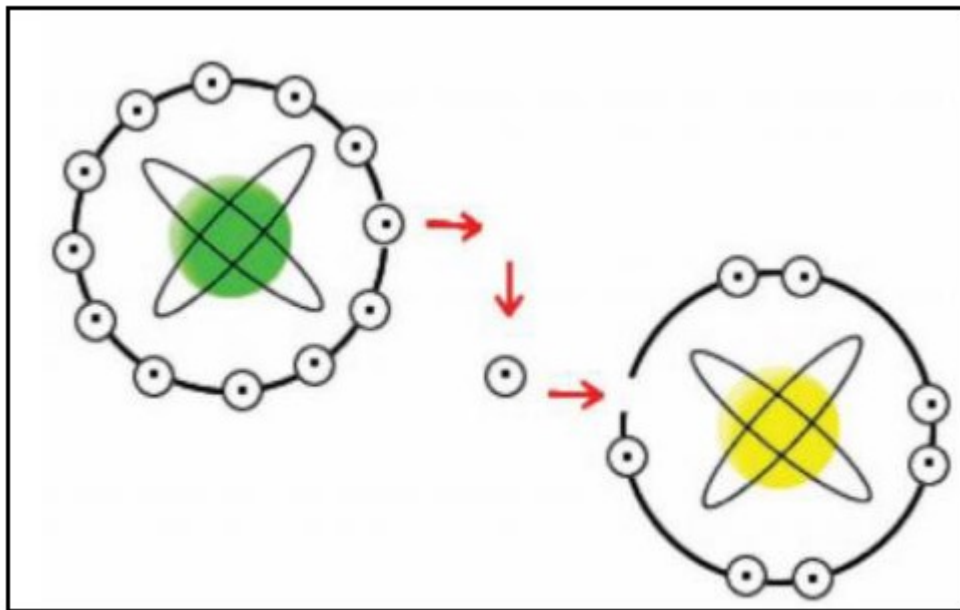


Imagen 2: Neutralización del radical libre por un antioxidante.

Según el modo de acción, los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios o terciarios:

- Primarios: si impiden la formación de radicales libres, frenan la reacción en cadena de los radicales libres especialmente de las especies reactivas del oxígeno o son quelantes de metales de transición.
- Secundarios: Interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres o desplazan las especies reactivas del oxígeno.
- Terciarios: Reparar el daño causado a las moléculas por los radicales libres o eliminan aquellas que se han estropeado.

El cuerpo tiene mecanismos de defensa para neutralizar el estrés oxidativo mediante el uso de agentes antioxidantes que se pueden producir en las células (agentes endógenos) o ser suministrados a través de alimentos (agentes exógenos).

Los compuestos antioxidantes presentan las propiedades adecuadas para su uso como conservantes alimentarios, pudiendo evitar el deterioro que causan en los alimentos los procesos oxidativos.

En la actualidad presentan un gran interés nutricional y, de hecho, diversas organizaciones recomiendan el consumo diario de cinco raciones de fruta o verdura para asegurar la ingesta de antioxidantes y prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

1.5.1. Métodos para medir el poder antioxidante en alimentos.

1.5.1.1. Determinación de fenoles totales:

Los compuestos fenólicos incluyen un amplio grupo de moléculas que tienen una estructura similar formada por un anillo bencénico sustituido con uno o varios grupos hidroxilos (-OH) y con una cadena lateral funcional. Los polifenoles se clasifican de acuerdo al número de anillos bencénicos que poseen y a los elementos estructurales que pueden unirse a otros anillos. Los principales grupos de polifenoles son: flavonoides, ácidos fenólicos, taninos (hidrolizables y condensados), estilbenos y lignanos (Ignat et al., 2011).

El método para determinar fenoles totales, consiste en la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu para reducir los fenoles y así determinar su presencia.

1.5.1.2. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), método directo:

El método TEAC sirve para cuantificar la capacidad antirradicalaria de los compuestos antioxidantes, es decir, para cuantificar la captura de los radicales libres.

En este ensayo se estima la capacidad para reducir el radical $ABTS^{\cdot+}$, estable, que se genera por oxidación con persulfato potásico ($K_2S_2O_8$) del ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonato sal diamónica), obteniendo un producto coloreado que presenta un máximo de absorción a 734 nm.



A este radical positivo se le añade el antioxidante que queremos estudiar y la capacidad antioxidante se mide como habilidad de los compuestos para disminuir el color reaccionando directamente con el radical $ABTS^{\cdot+}$.

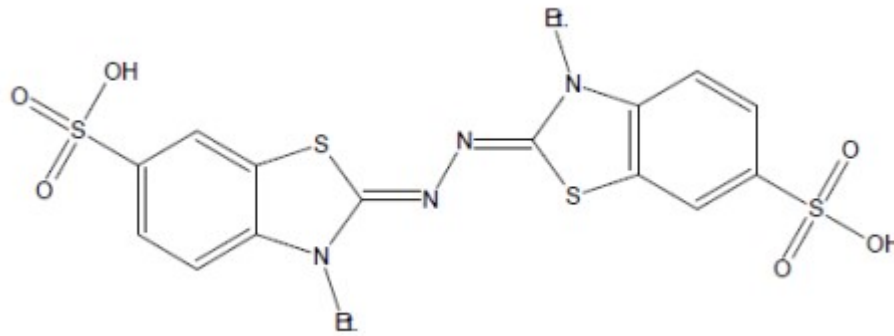


Imagen 3: Estructura química del ABTS proyectada.

1.5.1.3 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity):

Este método se aplica para asegurar la capacidad antioxidante de muestras biológicas y alimentos. Este ensayo mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente después de haber sido mezclada con radicales libres, en este caso se usa el azoderivado AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloruro). Estos azoderivados producen radicales peroxilo por calentamiento que dañan a la molécula fluorescente. Los antioxidantes protegen la molécula fluorescente de la degeneración oxidativa de la señal de fluorescencia. Así el ensayo combina tiempo y disminución de la inhibición, a diferencia del método TEAC que solo evalúa la disminución de la inhibición.

1.5.1.4 FRAP (Ferric Reducing Activity Power):

El método determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . Se trata de un método espectrofotométrico puesto que mide la absorbancia del Fe^{2+} . Así, cuanto más antioxidante es la sustancia mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe^{2+} y más alta la señal de absorbancia.

1.5.1.5 Ensayo de capacidad antioxidante frente al radical DPPH:

El objetivo de este ensayo es evaluar la capacidad que tiene un antioxidante para capturar radicales libres. Se basa en la estabilidad de la molécula de DPPH (2,2-

difenil-1-picrilhidrazilo) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado. Esta deslocalización le otorga una coloración violeta. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que le puede donar un átomo de H o con una especie radical (R) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida de color y por tanto pérdida de absorbancia en función de la capacidad antioxidante de las muestras.

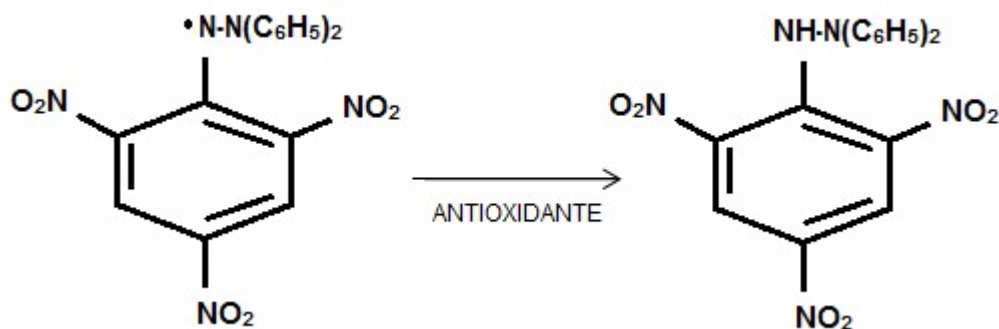


Imagen 4: Reacción entre el radical DPPH(2,2 difenil-1-picrilhidracil), violeta; y la especie antioxidante que actúa donando átomos de H y da como resultado una estructura molecular reducida estable, DPPH-H (2,2 difenil-1-picrilhidrazina) que detiene la reacción en cadena y que provoca un cambio de color morado a amarillo y la absorbancia de la solución decrece.

1.5.2 Oxidación de lípidos:

La oxidación de los lípidos es la segunda causa de deterioro de los alimentos, después de la acción de los microorganismos. Tiene como consecuencias las alteraciones en el aroma, en el sabor, en el color, la pérdida de determinados nutrientes y la formación de sustancias potencialmente nocivas (Cao et al., 1993).

La imagen 4 resume los mecanismos de oxidación de lípidos. Se observa que la etapa de iniciación es una etapa de formación de radicales libres, la propagación es una reacción de radicales libres con oxígeno y en la terminación hay una serie de productos principales entre los que se encuentran en especial los aldehídos, causantes de los olores y sabores característicos de alimentos enranciados.

Iniciación:	$RH \longrightarrow R\cdot + H\cdot$	Radical libre
Propagación:	$R\cdot + O_2 \longrightarrow ROO\cdot$ $ROO\cdot + RH \longrightarrow R\cdot + ROOH$	Radical hidroperóxido Hidroperóxido
Terminación:	$R\cdot + R\cdot \longrightarrow RR$ $R\cdot + ROO\cdot \longrightarrow ROOR$ $ROO\cdot + ROOR \longrightarrow ROOR + O_2$ $RO\cdot + R\cdot \longrightarrow ROR$ $2RO\cdot + 2ROO\cdot \longrightarrow 2ROOR + O_2$	Compuestos muy estables

Imagen 5: Mecanismos de oxidación de lípidos.

1.5.3 Oxidación de proteínas:

Las proteínas son compuestos nitrogenados constituidos por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Las propiedades nutritivas y las características físicas y químicas dependen del tipo, concentración y secuencia de unión de los aminoácidos constituyentes en las proteínas (Badui, 1993).

La oxidación de proteínas se define como la modificación covalente de una proteína inducida ya sea directamente por especies reactivas de oxígeno (ROS) o indirectamente por reacción con un subproducto secundario de estrés oxidativo (Turhan et al., 2009).

En el tejido muscular se producen procesos metabólicos como consecuencia de la oxidación de lípidos, y estos procesos aumentan la formación de ROS (anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH\cdot$), óxido nítrico etc.), que dañan las biomoléculas como proteínas, lípidos, ADN e hidratos de carbono. (Hussain et al., 2008).

Los procesos oxidativos son los mayores causantes del deterioro de los atributos de color, sabor y composición nutricional. (Martinaud, 1997).

La formación de carbonilos puede ser un indicador temprano de la oxidación de las proteínas.

1.6 Aspectos legislativos:

La aplicabilidad de la tecnología de los recubrimientos comestibles al sector de la agricultura y la alimentación ecológica deberá tener en cuenta que los ingredientes estén autorizados por las legislaciones de obligado cumplimiento.

El reglamento (CE) 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo habla sobre aditivos alimentarios y el reglamento (UE) 231/2012 establece especificaciones para estos aditivos. El glicerol se utiliza en los films realizados en este trabajo, para gelificar. Otros agentes gelificantes son los ficocoloides que son polisacáridos procedentes de algas y también se consideran aditivos. Tabla 2:

NºE	ADITIVO
E-400	Ácido algínico
E-401	Alginato de sodio
E-402	Alginato de potasio
E-403	Alginato de amonio
E-404	Alginato de calcio
E-405	Alginato de propano-1,2-diol
E-406	Agar
E-407	Carragenano
E-422	Glicerol

Tabla 2: Algunos aditivos autorizados por la legislación Española en la actualidad.

En el reglamento Europeo 133/2008 sobre aditivos alimentarios se observa en el capítulo 1 de definiciones que el quitosano forma parte del subapartado de sustancias utilizadas en los materiales de recubrimiento o revestimiento que no forman parte de los alimentos y que no están destinadas a ser consumidas con ellos, por lo que no tiene valores restrictivos en cuanto a su uso como aditivo. Las características de este subproducto y aplicaciones quedan incluidas en la “Guía para el aprovechamiento de los subproductos de pescado para la obtención de productos funcionales y bioactivos” del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

Las algas son denominadas nuevos alimentos y su puesta en el mercado en la comunidad de alimentos fue incluida en el Reglamento (CE) 258/97 del Parlamento Europeo y del consejo sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios.

Para la puesta en el mercado de estos productos hay que acudir a la Recomendación 97/618/CE, de 29 de Julio de 1997, (referente a aspectos científicos y a la presentación de la información necesaria para secundar las solicitudes de puesta

en el mercado de nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios) y al Reglamento no 718/2013/UE, de 25 de julio de 2013 (relativo al etiquetado de alimentos e ingredientes alimentarios con fitoesteroles, presentes en algas).

1.7 Alimentos funcionales:

Los alimentos funcionales se caracterizan por ir más allá de su función nutritiva, y cumplir una función específica como puede ser que mejora la salud, evitando contraer ciertas enfermedades. Para su desarrollo, se les agregan componentes biológicamente activos como pueden ser antioxidantes, minerales, vitaminas, ácidos grasos, etc desarrollando un proceso de fortificación del alimento.

Este tipo de alimentos supone un campo emergente de la ciencia de los alimentos donde se ve una amplia posibilidad de investigación, como lo es el presente trabajo.

2. OBJETIVOS:

El presente trabajo evalúa el efecto de los recubrimientos formulados con algas y con sus extractos para su incorporación en hamburguesas de carne de trucha y el posterior estudio de estas en relación con una serie de parámetros.

Se realizan análisis de color, de pH, de actividad de agua, estudios de antioxidantes, de oxidación lipídica y proteica.

Se busca aumentar la vida útil de estas hamburguesas de pescado por lo que el estudio se realiza en diferentes días. Además se busca conservar las propiedades del pescado.

El objetivo final es estudiar el efecto de estos films sobre la vida útil de estas hamburguesas y cómo influyen los recubrimientos a la hora de la conservación de sus propiedades nutricionales y bioactivas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1. MATERIALES:

3.1.1. Reactivos químicos:

Los reactivos que se han utilizado durante la realización de este trabajo fueron de grado alimentario en su mayoría y de alta pureza:

REACTIVO	ORIGEN
Ácido gálico	Sigma Aldrich Co
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Sigma Aldrich Co
Carbonato de sodio	Sigma Aldrich Co
ABTS	Sigma Aldrich Co
K ₂ S ₂ O ₈	Sigma Aldrich Co
Trolox	Sigma Aldrich Co
Metanol	Panreac
Tampón fosfato	Sigma Aldrich Co
Fluoresceína	Sigma Aldrich Co
Cloruro férrico	Sigma Aldrich Co
Tricloruro de hierro hexahidratado	Sigma Aldrich Co
Ferrocianuro potásico	Sigma Aldrich Co
Ácido tricloroacético (TCA)	Panreac
Quitosano	Guinama
Ácido acético glacial	Panreac
Peptona salina	AES
Ácido tiobarbitúrico (TBA)	Sigma Aldrich Co
Malondialdehído(MDA)	Sigma Aldrich Co
2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)	Sigma Aldrich Co
Hidrocloruro de guanidina (Guanidina)	Sigma Aldrich Co
HCl	Panreac
Glicerol	Acofarma

Tabla 3: Reactivos químicos utilizados.

3.1.2. Materiales biológicos:

3.1.2.1. Algas

Espagueti de Mar (*Himanthalia elongata*) y Dulce (*Palmaria palmata*). Ambas han sido suministradas por la empresa gallega Porto Muiños.

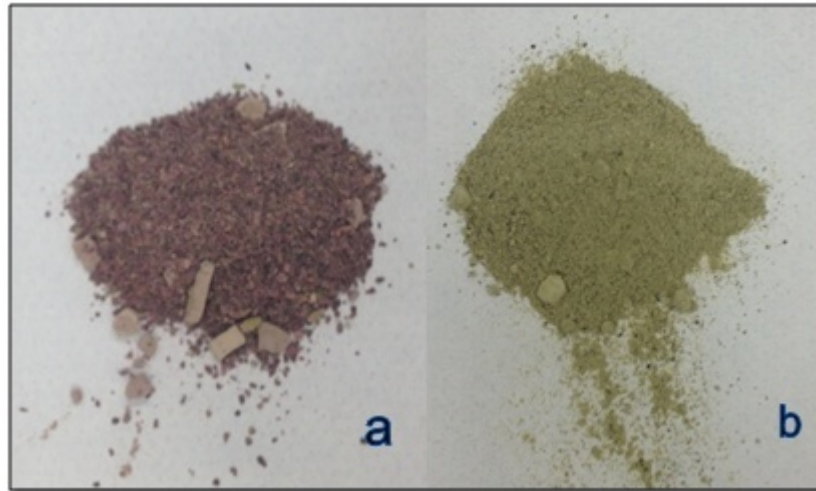


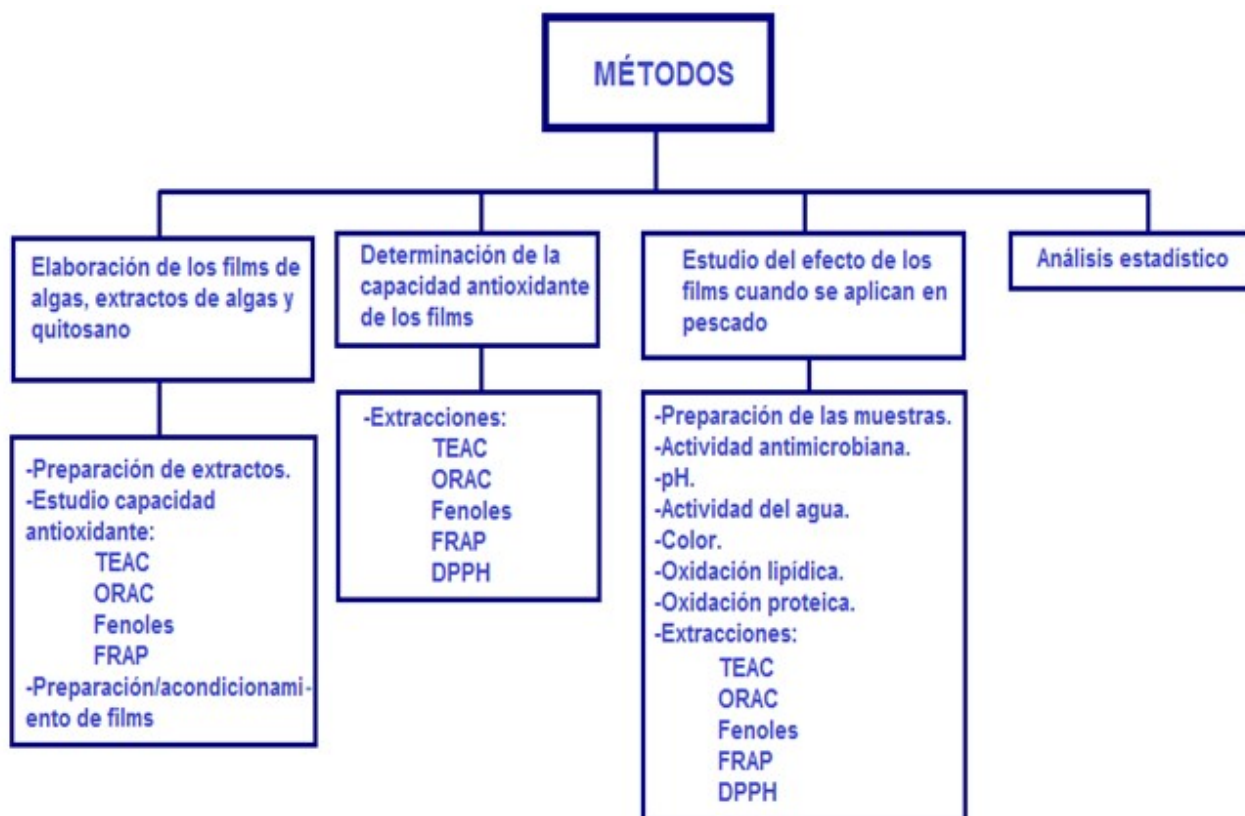
Imagen 6: a) Polvo de alga Dulse, b) Polvo de alga Espagueti de Mar.

3.1.2.2. Truchas:

Se utilizan truchas asalmonadas (*Oncorhynchus mykiss*) proporcionadas por la piscifactoría IPEASA (Fuentidueña, Segovia).

3.2. MÉTODOS:

En el presente trabajo los métodos utilizados se describen a continuación:



3.2.1. ELABORACIÓN DE LOS FILMS DE QUITOSANO, ALGAS Y EXTRACTOS DE ALGA.

3.2.1.1. Preparación de los extractos de las algas:

Para comenzar se deben realizar extracciones sólido-líquido de las algas para la fabricación de los films. Para ello, se añaden 10 g de alga por cada 200 ml de H₂O y se homogeneizan en un homegeneizador ultraturax (T25 Digital, IKA-Werke, Alemania) y a continuación se mantiene con agitación en placa durante una hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se distribuye en tubos falcon de 50 ml y se centrifuga a 4000 rpm durante 15 minutos (Centrífuga modelo 5810 refrigerada de eppendorf). Se recoge el sobrenadante (fracción A).

Posteriormente se disuelve el sedimento en 200 ml de H₂O y se homogeneiza en el homogeneizador ultraturax, se agita en placa a 95°C y una vez que está a temperatura ambiente se distribuye en tubos falcon de 50 ml y se centrifuga a 4000 rpm durante 20 minutos. Se recupera el sobrenadante. (fracción B).

3.2.1.2. Estudio de la capacidad antioxidante de los extractos de algas:

A continuación se describen las diferentes metodologías utilizadas para la determinación de la capacidad antioxidante de estos extractos obtenidos de las algas.

3.2.1.2.1. Determinación de fenoles totales:

La oxidación de fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. De este modo, la concentración de fenoles totales fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu que es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (obtenido a partir de Na₂WO₄·2H₂O y Na₂MoO₄·2H₂O que se reduce a una mezcla de estados +6/+5).

Se mezclan 140 µL de los extractos de las algas con 280 µL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:10 en agua y 980 µL de disolución de carbonato de sodio 42,86 mM. Tanto la dilución del reactivo de Folin-Ciocalteu como la de carbonato se realizan en agua destilada. Se agita y se deja en reposo y oscuridad durante 100 minutos. Después se centrifuga (centrífuga modelo 5418 de eppendorf) durante 3 minutos a 13500 rpm. La absorbancia se mide a 760 nm en un lector de placas (EME 1081 Fluostar Omega). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por gramo de muestra usando una curva de calibración de ácido gálico (70 µM a 9,8 µM).

3.2.1.2.2. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), método directo:

En este método se mide la capacidad antioxidante de un compuesto como la capacidad de estos para disminuir el color de una sustancia reaccionando directamente con el radical ABTS^{•+}.

El análisis se llevó a cabo según describen Siddhuraju et al., (2007). Se prepararon 10 ml de una solución 7 mM de ABTS con 10 ml de K₂S₂O₈ 2,45 mM en agua ultrapura, y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 24 h para la

formación del radical. Pasado este tiempo se diluye en tampón fosfato pH 7,4 hasta obtener un valor de absorbancia de 0,70 ($\pm 0,2$) a 730 nm.

Se preparó una curva de estándares de trolox con metanol de concentraciones 240, 120, 60, 30 y 15 μM .

Tanto la fracción A como la B de los extractos de las algas se diluyen en metanol (1:10 w:w y 1:100 w:w). En placas de 96 pocillos de poliestireno transparente se añadieron 20 μL de las soluciones correspondientes a la curva de los estándares de trolox, 20 μL de cada muestra por duplicado y 20 μL metanol con 200 μL de tampón fosfato pH 7,4 para el blanco. La solución de radical ABTS⁺ se añade en cada pocillo en un volumen de 200 μL , excepto en el blanco que no se añade. Se deja incubar la placa 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente y a continuación se mide la absorbancia a 730 nm.

Los resultados se expresaron en μmol equivalentes de Trolox por g de muestra.

3.2.1.2.3. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity):

Para realizar este ensayo tenemos que tener en cuenta que los radicales peróxidos atacan a la fluoresceína y esta reacción es observable por la pérdida de fluorescencia. Los antioxidantes suprimen esta reacción por un mecanismo de transferencia de átomos de hidrogeno, inhibiendo la degradación oxidativa de la señal de fluoresceína.

Para realizar el ensayo se prepara una curva de estándares de trolox con concentraciones 120, 90, 60, 30, 15 y 7,5 μM . Tanto la fracción A como la B de ambas algas fueron diluidas (1:10 y 1:100) en tampón fosfato (75mM pH 7,4). En cada pocillo de la microplaca de poliestireno se añade 25 μL de cada estándar de trolox, 25 μL de cada dilución de muestra por duplicado y 25 μL de tampón para el blanco. A todo esto se le añade 150 μL de fluoresceína en cada pocillo.

Se prepara una disolución de AAPH 153mM en tampón fosfato que va a actuar como generador de radicales y es aplicada automáticamente por el lector de placas (FluOstar Omega, BMG), iniciándose la reacción. La intensidad de la fluoresceína fue monitorizada usando 485 nm excitación y 528 nm emisión cada minuto durante 120 minutos en el lector de placas. A medida que la reacción avanza, la fluoresceína se consume y la intensidad de la misma disminuye.

La capacidad antioxidante es proporcional al área bajo la curva (AUC) de la muestra en comparación con la AUC del blanco, donde el antioxidante no está presente. Se obtiene una curva estándar con la AUC de una curva patrón de Trolox. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de Trolox por g de muestra.

3.2.1.2.4. FRAP (Ferric Reducing Activity Power):

El poder reductor de los extractos se determinó según el método descrito por Oyaizu (1986), con pequeñas variaciones.

Antes de comenzar se prepara una disolución de cloruro férrico al 0,1%, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ acidificada con HCl, en agua ultrapura. Se prepara otra disolución de ferrocianuro potásico al 1%, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1%, acidificada con HCl en agua ultrapura, tampón fosfato 0.2 M y $\text{pH}=6,6$ con $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y Na_2HPO_4 y, por último preparamos una disolución de ácido tricloroacético (TCA) al 10% p/v.

Para realizar el ensayo se añaden en un tubo falcon 0,5 ml de muestra; 1,25 ml de tampón fosfato y 1,25 ml de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1%, se agita y se incuba en un baño a 50°C durante 20 minutos. A continuación se atempera y se añaden 1,25 ml de la disolución de TCA. Después se agita vigorosamente y se retiran 1,25 ml hasta tener un volumen total de 3 ml de mezcla de muestra. Luego se añaden 0,25 ml de FeCl_3 y se agita de nuevo. Tras dejarlo reposar dos minutos se mide la absorbancia a 700 nm.

Los resultados se expresan en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra.

3.2.1.3. Preparación y acondicionamiento de los recubrimientos (films):

Se preparan recubrimientos de quitosano, y recubrimientos de algas Espagueti de Mar, de Dulse y de sus extractos como se observa en la imagen 7:

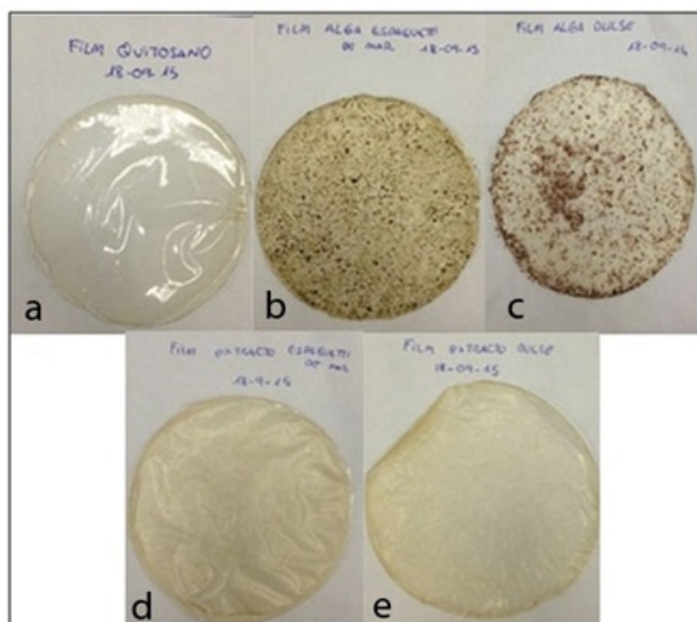


Imagen 7: a) Film de quitosano, b) Film de alga Espagueti de Mar, c) Film de alga Dulse, d) Film de extracto de alga Espagueti de Mar y e) Film de extracto de alga Dulse.

Para preparar la disolución de quitosano se añade quitosano al 1,5%, ácido acético glacial al 1% y agua destilada y se deja en un baño con agitación a 40°C hasta su completa disolución durante 2 horas, y luego con agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación se añaden 0,5 ml de glicerol (E-422 aditivo) por gramo de polímero y se agita a temperatura ambiente durante 2 horas.

Para preparar la disolución de las algas y sus extractos se siguen los mismos pasos que para preparar la disolución de quitosano y a continuación de añadir el glicerol y agitar durante 2 horas se añaden 2,5 g de alga por cada 250 ml de la disolución de quitosano en el caso de las algas, y 62,5 ml de la fracción A y 62,5 ml de la fracción B por cada 250 ml de la disolución de quitosano en el caso de los extractos de las algas.

Una vez preparadas las disoluciones se añaden 20 ml en cada placa (placas Petri 9,5 cm) y se deja secar a temperatura ambiente durante tres días. Antes de la realización de los análisis con los films, se acondicionan en el desecador con sal saturada de KBr con una humedad relativa del 58% con el fin de que ganen elasticidad.

3.2.2.DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS FILMS:

3.2.2.1.Extracciones de los films para realizar el estudio del poder antioxidante:

Se cortan los films de quitosano, de algas y de sus extractos en trozos pequeños de aproximadamente las mismas dimensiones y a continuación se añaden 200 mg de cada film a 30 ml de metanol, se agitan a 400 rpm durante 90 minutos a 30°C en un incubador y por último se centrifuga a 5500 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante.

3.2.2.1.1.TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity):

Se realiza el mismo ensayo que se ha realizado para las extracciones del alga en el apartado 3.2.1.2.2.

Cuando se realiza este ensayo se mide la capacidad de una sustancia para reducir el radical ABTS^{•+}. Este radical se genera al reaccionar el ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato sal diamónica) con persulfato potásico, K₂S₂O₈ y oxidarse. Se obtiene un producto coloreado que presenta un máximo de absorción a 734 nm.

Para proceder con este análisis se prepararon 10 ml de una solución 7mM de ABTS con 10 ml de K₂S₂O₈ 2,45 mM en agua ultrapura, y se incubó a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 24 horas hasta que se forme el radical y a

continuación se diluye en tampón fosfato pH=7,4 hasta obtener un valor de absorbancia igual a 0,70 (± 0.2).

Se prepara también una curva de calibrado con estándares de Trolox de 240 μ M a 15 μ M.

Se hacen diluciones de los extractos en metanol (1:10 w:w y 1:100 w:w). En placas de 96 pocillos de poliestireno transparente se añadieron 20 μ L de las soluciones correspondientes a la curva de los estándares de trolox, 20 μ L de cada muestra por duplicado y 20 μ L de metanol con 200 μ L de tampón fosfato pH 7,4 para el blanco. Posteriormente se añaden 200 μ L de la solución del radical ABTS⁺ a cada pocillo, excepto en el blanco que no se añade. A continuación se incubó la placa durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 730 nm.

Los resultados se expresan en μ mol equivalentes de Trolox por gramo de muestra.

3.2.2.1.2.ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity):

El ensayo para los extractos de algas se realizó como se indica en el apartado 3.2.1.2.3.

Se prepara una curva de calibrado de Trolox de 240 μ M a 7,5 μ M con tampón fosfato.

Las muestras fueron diluidas (1:10 y 1:100) en tampón fosfato (75mM pH 7,4). En cada pocillo de la microplaca de poliestireno se añade 25 μ L de cada estándar de trolox, 25 μ L de cada dilución de muestra por duplicado y 25 μ L de tampón para el blanco. A esto se le añade 150 μ L de fluoresceína en cada pocillo y el radical AAPH es inyectado directamente por el lector de placas, iniciándose la reacción.

Los resultados fueron expresados en μ mol equivalentes de Trolox por gramo de muestra.

3.2.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS FILMS SOBRE LA VIDA ÚTIL DEL PESCADO:

3.2.3.1.Preparación de las muestras:

Se pica la carne del pescado para hacer hamburguesas de 9 cm de diámetro, aproximadamente (lo mismo que el film). Se hacen 6 tratamientos diferentes para cada día de análisis: hamburguesa sin tratar, tratada con film de quitosano, con film de

Espagueti de Mar, con film de Dulse, con film de extracto de Espagueti de Mar y con film de extracto de Dulse. Los días de análisis son: día 0, día 2, día 5 y día 7. Las hamburguesas con los films se mantienen en refrigeración con los diferentes tratamientos para proceder a su estudio en los diferentes días.

3.2.3.2.Actividad Antimicrobiana:

Este es el primer análisis a realizar una vez sacadas las muestras de refrigeración para evitar la manipulación en la medida de lo posible. Se realiza el estudio de la actividad microbiana según la norma Española UNE ISO 4833 (Mayo 2003). Las muestras se manipulan con ayuda de pinzas y tijeras en condiciones de esterilidad. Se introducen en una bolsa estéril 25 g de muestra con 225 ml de peptona salina con diluidor automático para preparar la dilución madre 10^{-1} . Se homogeneiza (Pulsifier) durante 1 min y a partir de esa dilución madre se preparan las diluciones seriadas 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , apropiadas para los microorganismos.

Después se realiza la siembra. Se toma 1 ml de cada dilución con una pipeta estéril y se vierten 12-15 ml del agar entre 44°C y 47°C y se agita en círculos para que se mezcle.

Las placas petri se invierten y se colocan en la estufa.

Para cada muestra, se sembraron en peptona salina las diferentes diluciones para los siguientes microorganismos:

- (i) Aerobios mesófilos determinados en PCA (Plate Count Agar) después de una incubación a 30°C durante 72h.
- (ii) Bacterias totales en PCA después de una incubación a 4°C durante 72h para determinar organismos psicrófilos.

3.2.3.3.pH:

Para medir el pH se hace una disolución con 100 ml de H₂O destilada y 10 g de carne tratada con el film correspondiente y se realiza la medida de pH con un pHmetro (serie 75104, Crison)

3.2.3.4.Actividad de agua, Aw:

La actividad de agua hace referencia a la cantidad de agua libre disponible en los alimentos para el crecimiento microbiano. Todo el alimento contiene una fracción de agua que compone su estructura molecular, y hay otra parte disponible que es la que aprovechan los microorganismos para desarrollarse.

La actividad del agua se mide con el equipo Aqualab 4TE (Decagon Devices Inc, Pullman, WA, USA). El medidor de actividad de agua mide la actividad de agua de las muestras siguiendo la metodología de los sensores de punto de rocío. La muestra se equilibra dentro de una cámara sellada que contiene un espejo que permite detectar la condensación en él. Hay un punto de equilibrio en el que la humedad relativa del aire en la cámara es el mismo que la actividad del agua de la muestra y este punto es detectado por una célula fotoeléctrica. Además en el interior hay un termistor que detecta la temperatura exacta dentro de la cámara.

Se mide en valores de 0 a 1, siendo los valores más habituales en pescado de 0,95 a 0,99 en función de la especie. Cuanto mayor sea este valor, el alimento se considera más perecedero.

3.2.3.5.Color:

El equipo utilizado para la medida del color en las muestras fue un espectrofotómetro de reflectancia (CM-2600d, Konica Minolta Sensing, INC., Japón) que se coloca directamente sobre la muestra para hacer la medida.

El color se mide en el espacio de color de Hunter Lab que es un espacio de color rectangular en tres dimensiones que se basa en la teoría de los colores opuestos: L es la luminosidad y va del 0, que es negro, al 100 que es blanco; a (rojo-verde) donde los valores positivos son rojos, y los negativos son verdes; y b (azul-amarillo) donde los valores positivos son azules y los negativos son amarillos.

Se realizó la medida del color en cada muestra 8 veces en los diferentes días.

3.2.3.6.Determinación de la oxidación lipídica (TBARS):

En este caso se trabaja en frío con hielo para que la reacción de oxidación vaya más lenta.

Se prepara una disolución de TCA (CCl_3COOH) al 7,5 % cuya función es disolver la muestra para que precipiten las proteínas, y una disolución de TBA 0,02 M ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) con el que sucede la reacción de los componentes secundarios. Se prepara también una disolución de malondialdehído 6 mM, MDA ($\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}_4$) y a partir de esta se hacen los estándares con concentraciones 0,10 μM , 0,25 μM , 0,50 μM , 0,75 μM , 1,00 μM , 4,00 μM , 6,00 μM 12,00 μM y 100 μM . En este método se mide el malonaldehído formado como producto final de la degradación de hidroperóxidos generados por la oxidación de lípidos. (El MDA es de color rosa y puede ser medido espectrofotométricamente a 530 nm).

Para llevar a cabo el método se disuelven 10 g de cada muestra (6 muestras cada día excepto día cero que hay 1) en 30 ml TCA 7,5% , se homogeniza en el homogenizador Ultraturrax y a continuación se centrifuga a 4°C durante 15 minutos a 3250 rpm, se filtra (fast flow rate, Prat Dumas, France) y se hacen reaccionar 5 ml de este filtrado con TBA 0,02 M en un baño a 100°C durante 40 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se enfría con hielo y se mide la absorbancia a 530 nm .

Los resultados se expresaron en µg MDA/kg muestra.

3.2.3.7.Oxidación proteica, Carbonilos:

La oxidación de proteínas se define como la modificación covalente de una proteína inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS) o por reacciones con productos secundarios debidos al estrés oxidativo.

El método se realiza tal y como describen Levine et al., (1994) y consiste en la derivatización de los grupos carbonilos con 2,4-dinitrofenilhidrazina, $C_6H_6N_4O_4$ (DNPH), conduciendo a la formación de un producto estable, que puede ser medido por espectrofotometría.

Este método se basa en la derivatización del grupo carbonilo con DNPH y lleva a la formación de un producto estable de dinitrofenil hidrazona. El grupo dinitrofenil absorbe luz ultravioleta a 370 nm. Para ello se preparan los reactivos necesarios para este ensayo que son: DNPH 10 mM en 2 M HCl y Guanidina (Hidrocloruro de guanidina, $CH_5N_3 \cdot HCl$) 6 M en 20 mM KH_2PO_4 a pH 2,3.

Para comenzar se diluyen 0,5 g de muestra en Tris-buffer y se añaden 50 µL de BHT diluido en metanol. Se homogeniza esta solución y se separan tres volúmenes de 200 µL. Posteriormente se añaden 25 µL de TCA al 10% lo que provoca la precipitación de las proteínas presentes y a continuación se centrifuga (centrifuga modelo 5418 ROTOR estándar, Eppendorf) a 12000 rpm durante 3 minutos. Se descarta el sobrenadante y se añaden 500 µL de la solución de DNPH 10mM. Se agita y se deja 10 minutos en oscuridad para después añadir 50 µL de TCA 100% y centrifugar en las mismas condiciones. Se descarta el sobrenadante para quedarse con el sedimento que contiene la proteína. El sedimento se lava tres veces con etanol/etil acetato y se centrifuga tras cada lavado. Por último se redissuelve en 1 ml de la disolución de guanidina 6M y se deja reaccionar toda la noche para medir la absorbancia a 370 nm al día siguiente.

3.2.3.8.Extracciones de la muestra para realizar el estudio del poder antioxidante:

Se realizan las extracciones de las muestras para estudiar su poder antioxidante.

Se disuelve 1 g de cada muestra (previamente retirado el film) en 30 ml de MeOH/H₂O (50/50) pH 2 (se acidifica con HCl) y se homogeniza en ultraturrax. Se añaden 10 ml más de MeOH/H₂O pH 2 para limpiar el vaso antes de transferirlo a un tubo falcon y se agita durante una hora a temperatura ambiente. Luego se centrifuga durante 10 minutos a 2500 rpm y al sobrenadante se le denomina fracción A.

Se recupera el precipitado y se resuspende en 40 ml de acetona/agua (70/30) (v:v) y se agita a temperatura ambiente antes de centrifugarlo a 2500 rpm durante 10 minutos. Se obtiene, en este caso, la fracción B.

Para llevar a cabo los métodos que se detallan a continuación se mezclan ambas fracciones para unos resultados más satisfactorios.

3.2.3.8.1. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity):

Se lleva a cabo el mismo análisis que el indicado en el apartado 3.2.1.2.2 y 3.2.2.1.1: Se prepara la curva de calibrado de Trolox y se inyectan en cada pocillo de la placa 20 µL de cada uno de estos estándares, 20 µL de muestra y 20 µL de metanol para el blanco. Se añade a todos los pocillos 200 µL del radical ABTS⁺ y se deja la placa 1 hora en oscuridad para, a continuación, medir la absorbancia a 730 nm. Los resultados se expresan en µmol equivalentes de Trolox por gramo de muestra.

3.2.3.8.2. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity):

Se lleva a cabo el mismo análisis que el realizado en el apartado 3.2.1.2.3 y 3.2.2.1.2: Se prepara la curva de calibrado de Trolox y se hacen las diluciones de la muestra. Se inyecta en la placa 25 µL de tampón fosfato pH 7,4, 25 µL de cada estándar por duplicado, y 25 µL de cada muestra por duplicado (diluída). A esto se le añaden 150 µL de fluoresceína 50 mM y la disolución de AAPH se añade directamente por el lector de placas. Los resultados se expresan en µmol TROLOX equivalentes por gramo de muestra.

3.2.3.8.3. Ensayo de capacidad oxidante frente al radical DPPH:

Se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) que se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado. Esta deslocalización le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción alrededor de 515 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia como definen Brand-Williams et al.,(1995).

En placas de 96 pocillos de poliestireno transparente se añaden 25 μL de muestra por duplicado, 25 μL de metanol como control y 150 μL como blanco y a todo esto se le añadieron 100 μL de agua ultrapura. De la solución de DPPH se añaden 125 μL a cada pocillo y se deja incubar la placa en oscuridad durante 30 minutos. A continuación se mide la absorbancia a 515 nm en un lector de placas (FluOstar Omega, BMG).

Los resultados finales se expresan como % reducción, que se obtienen tras medir la absorbancia a 515 nm del blanco y de las muestras, considerando el descenso debido a la reducción del radical DPPH.

3.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se han realizado los análisis por duplicado.

Se llevó a cabo un análisis de la varianza multifactorial (ANOVA) ($p < 0,05$) para cada variable teniendo en cuenta como factores el tratamiento que se le da a las muestras (muestras sin film o tipo de film que llevan) y el almacenamiento de estas en el tiempo (días de ensayo).

El software utilizado fue el Statgraphic Centurium XVII-X64. Este software ejecuta un análisis de varianza de varios factores para un factor en concreto a determinar. Realiza, además, varias pruebas y gráficas para determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el factor analizado. También evalúa la significancia de las interacciones entre los factores.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4.1. Análisis de la capacidad antioxidante de las algas.

La capacidad antioxidante de los extractos del alga Espagueti de mar y Dulse se analizó con objeto de conocer cuál de los dos tiene mejores propiedades antioxidantes y comparar estos datos posteriormente con los resultados obtenidos al aplicar los films de estas algas en las hamburguesas de pescado.

La capacidad antioxidante se analiza tal y como se describe en el apartado 3.2.1.2 para los extractos del alga Espagueti de mar y Dulse.

En primer lugar se analiza el contenido fenólico que se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra.

Como se puede observar en la figura 1 el alga Espagueti de mar tiene un contenido fenólico mayor que el alga Dulse con valores aproximadamente 4 veces superiores. La figura 1 representa una media de los valores obtenidos tras estudiar los fenoles en el alga Dulse y en el alga Espagueti de mar.

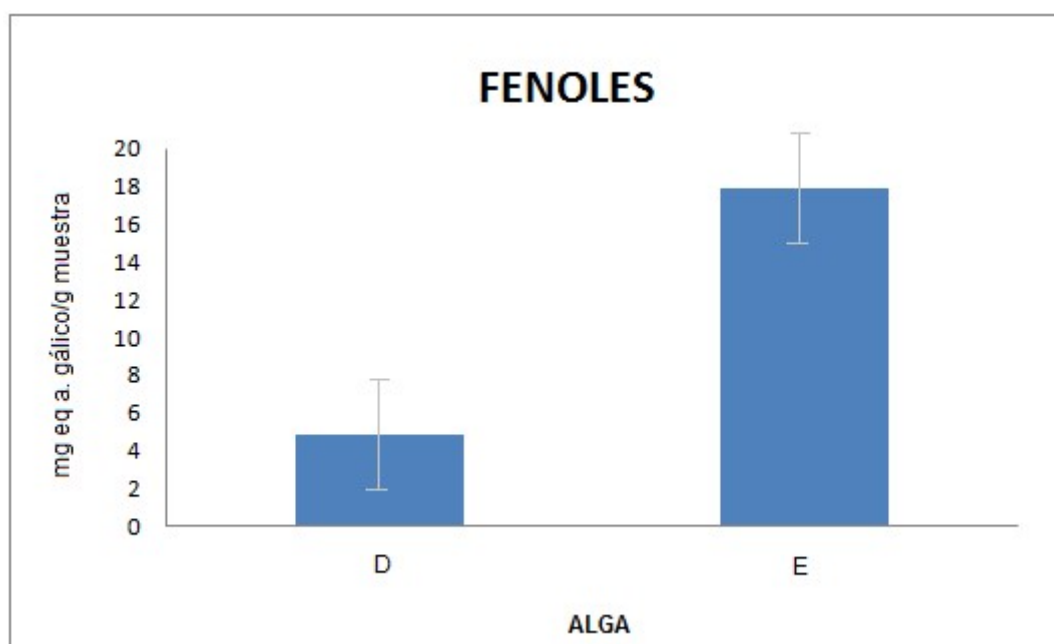


Figura 1: Variación del contenido de fenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/gramo de muestra) de las algas Dulse (D) y Espagueti de mar (E)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad antioxidante está principalmente correlacionada con el contenido fenólico (Pawlowska et al., 2012). Los compuestos fenólicos pueden actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno y como quelantes de metales.

Estos resultados se correlacionan con métodos como FRAP y ORAC entre otros, donde los resultados fueron similares. En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos por el método FRAP en mg equivalentes de Fe^{2+} por gramo de muestra. La figura presenta una media de los valores obtenidos al medir las muestras, observándose que este valor es aproximadamente 10 veces mayor para el alga Espagueti de mar, indicando por tanto que este alga tiene mayor poder antioxidante según el método de FRAP.

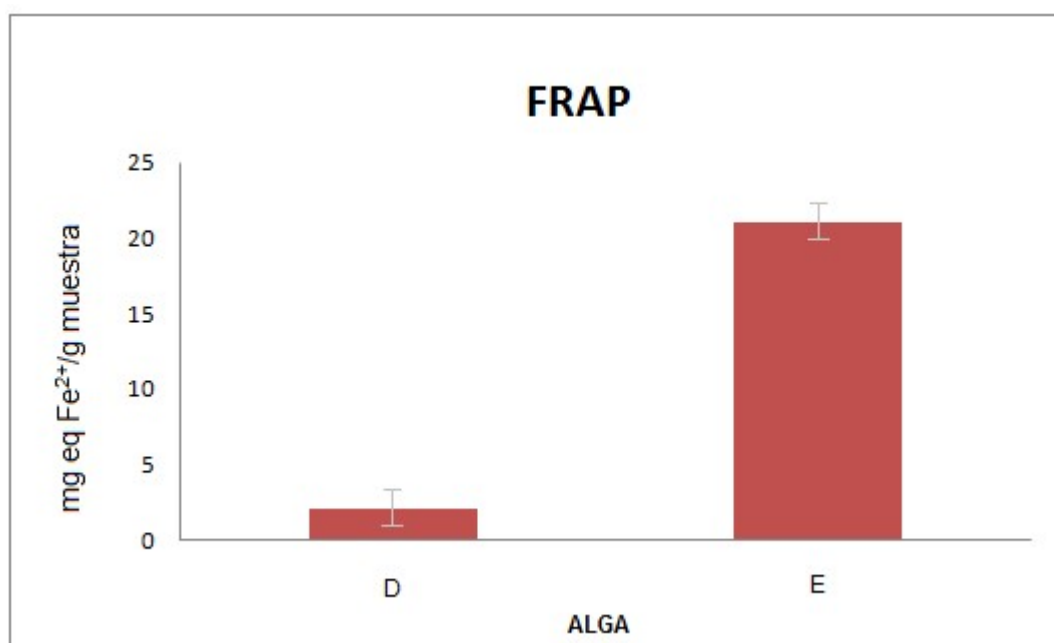


Figura 2: Estudio del poder reductor de las algas Dulse (D) y Espagueti de mar (E).

En el método de FRAP se determina la capacidad antioxidante de forma indirecta a través del poder que tiene la sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . Cuanto más antioxidante sea una sustancia mayor será esta reducción y mayor la concentración de Fe^{2+} .

Cuando la actividad antioxidante de los extractos de algas se analizó mediante el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) como se indica en el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

apartado 3.2.1.2.3, se observa de nuevo una mayor capacidad antioxidante del alga Espagueti de mar. Este método mide la capacidad de los antioxidantes de inhibir la degradación oxidativa de la señal de fluoresceína al enfrentarse a esta con las muestras. Esta capacidad antioxidante es proporcional al área bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína.

En la figura 3 se observan los resultados obtenidos por el método ORAC en las muestras de Espagueti de mar y Dulse. Estos resultados muestran que por este método el alga que mayor poder antioxidante tiene es, de nuevo, el Espagueti de mar.

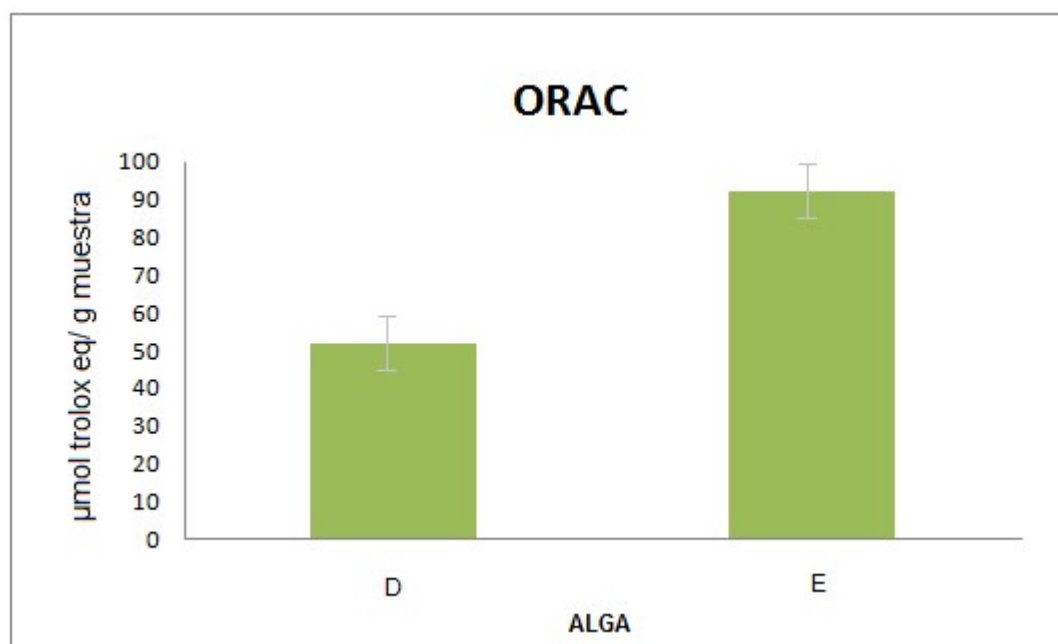


Figura 3: ORAC de las algas Dulse (D) y Espagueti de mar (E).

Los estudios de la capacidad antioxidante que tienen las algas para reducir el radical $ABTS^+$, se llevaron a cabo como se indica en el apartado 3.2.1.2.2. Para ello se hace reaccionar la muestra con este radical, que es estable, y se obtiene un producto coloreado. Los compuestos que tienen mayor habilidad para disminuir el color de este producto serán compuestos antioxidantes.

Como se observa en la figura 4 el alga Espagueti de mar tiene mayor poder antioxidante que el alga Dulse. La figura muestra una media de los resultados para las muestras tomadas:

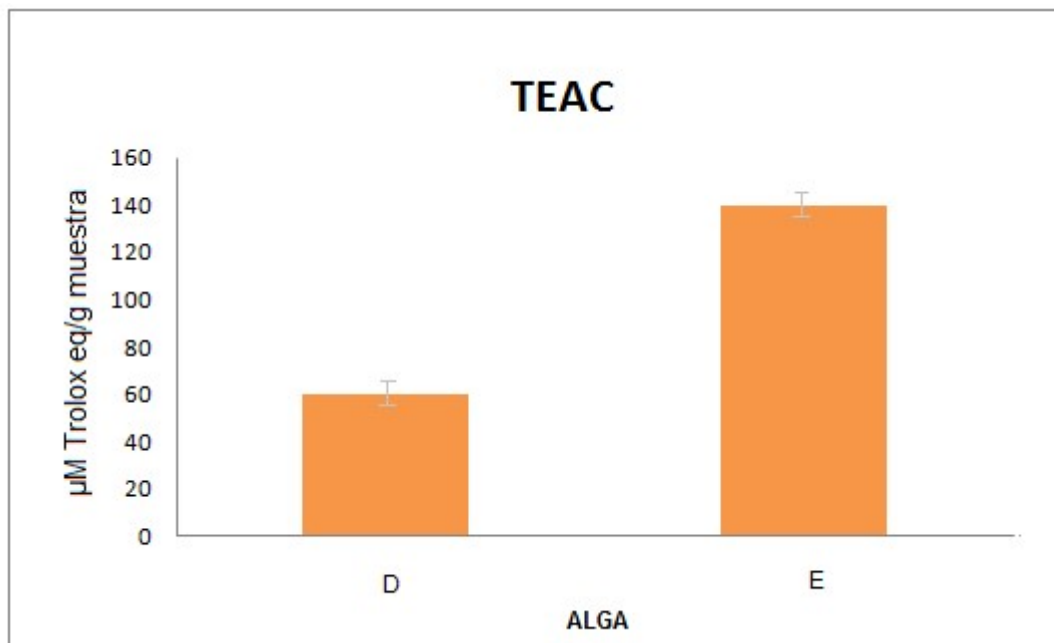


Figura 4: TEAC de las algas Dulce (D) y Espagueti de mar (E).

Tras llevar a cabo la medida del poder antioxidante por los diferentes métodos, se concluye que es el alga Espagueti de mar la que más propiedades antioxidantes tiene, y esto se tiene en cuenta a la hora de realizar los apartados posteriores.

4.2. Determinación de la capacidad antioxidante de los recubrimientos.

Una vez que se conoce la actividad antioxidante de los extractos de alga, se puede proceder a la fabricación de los recubrimientos para aplicárselos al pescado. Antes de esto es necesario conocer la actividad antioxidante de estos films formulados con algas y quitosano.

Las figuras 5 y 6 representan los valores obtenidos para los distintos recubrimientos. Con todos los métodos los resultados indican que el film que tiene menos capacidad antioxidante es aquel que lleva solo quitosano en su formulación. Los films de algas son los que tienen mayor capacidad antioxidante, destacando especialmente el del alga Espagueti de mar.

La figura 5 muestra la media de los resultados obtenidos al realizar el método ORAC a los distintos recubrimientos.

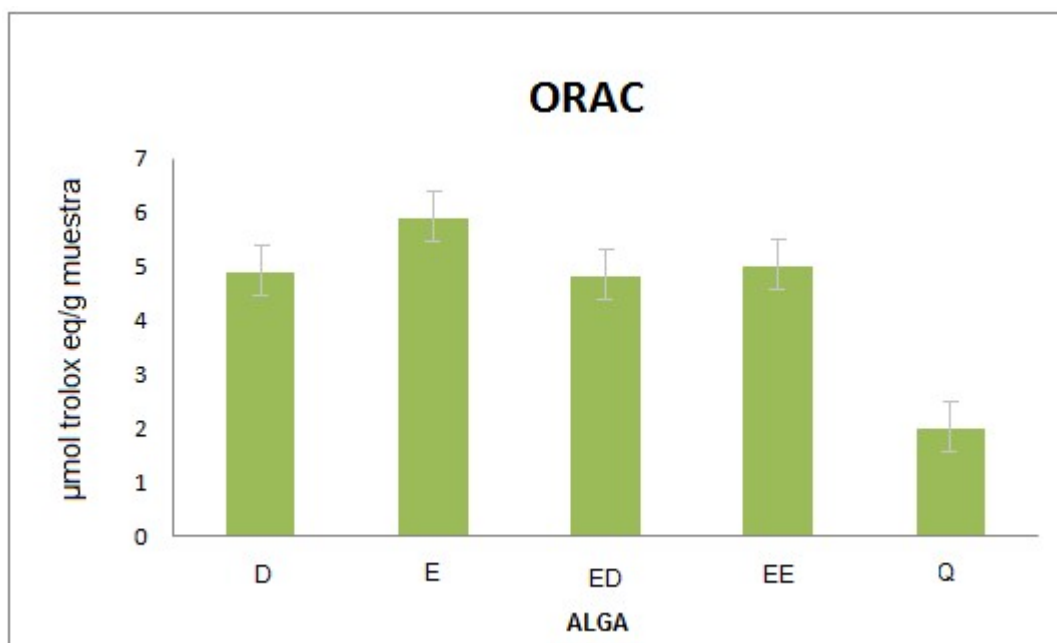


Figura 5: ORAC de los diferentes tratamientos dados a las muestras: Recubrimiento de algas Dulse (D), Espagueti de mar (E), extracto de Dulse (ED), extracto de Espagueti de mar (EE) y quitosano (Q).

La figura 6 muestra la media de los resultados obtenidos al aplicar el método TEAC a los diferentes recubrimientos. Se observa de nuevo que el quitosano es el recubrimiento que menor poder antioxidante tiene.

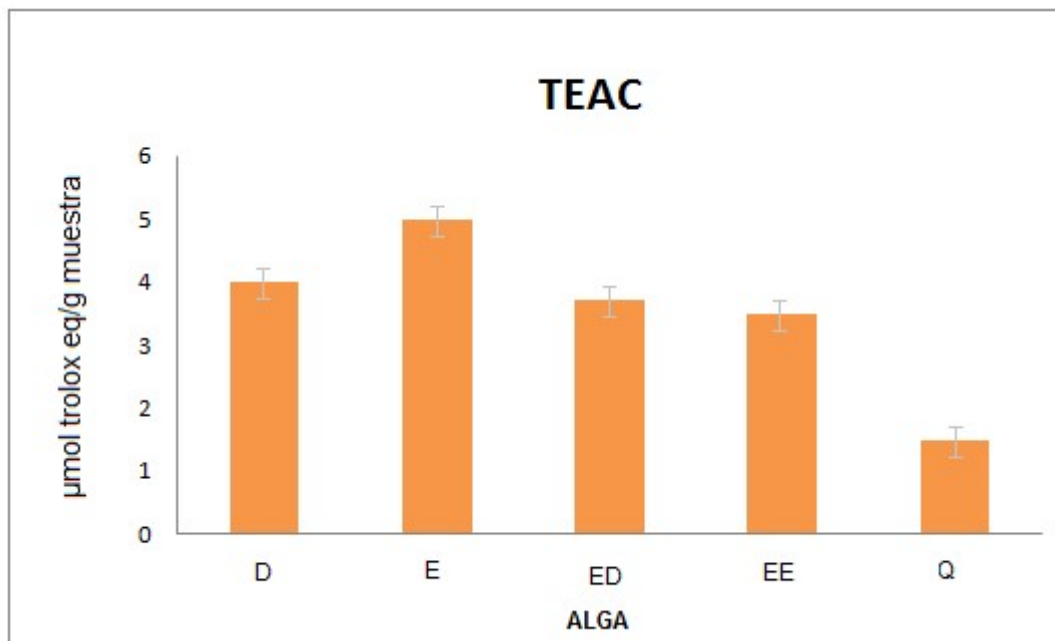


Figura 6: TEAC de los diferentes tratamientos dados a las muestras: Recubrimiento de algas Dulse (D), Espaguete de mar (E), extracto de Dulse (ED), extracto de Espaguete de mar (EE) y quitosano (Q).

Los recubrimientos fabricados con algas y quitosano tienen un mayor poder antioxidante que aquellos que sólo llevan quitosano debido a que las algas tienen un mayor poder antioxidante que se suma al que ya tiene el quitosano. Se observa que el que mayor poder antioxidante tiene es el del alga Espaguete de mar.

Cuando se evalúa el poder antioxidante de los films por el método FRAP y por el contenido de fenoles totales se obtienen valores muy bajos debido posiblemente a que el método no está optimizado. Puede haber un error con los disolventes utilizados en la extracción o un problema con el tiempo de extracción.

4.3. Estudio del efecto conservador de los films sobre la vida útil del pescado.

4.3.1. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó como se indica en el apartado 3.2.3.2 para muestras almacenadas a tiempos 0, 2, 5 y 7 días. Cabe destacar que a día 0 los films todavía no han actuado, por lo que los resultados van a ser los mismos para todos los recubrimientos. Los estudios microbiológicos se representan en log N, que son unidades formadoras de colonias por cada gramo de muestra. Estos resultados

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mostraron que el global de organismos (aerobios mesófilos y psicrófilos) crecía de manera significativa ($p < 0,05$) a lo largo del almacenamiento, presentando el día 7 los valores más elevados. Esto es de esperar puesto que hay una degradación y un crecimiento microbiano en el pescado con el paso del tiempo.

La figura 7 muestra el crecimiento de colonias de psicrófilos, cultivados a 4 °C, a lo largo de los días para los diferentes tratamientos. A día 0 se obtiene el mismo resultado para todos los tratamientos, se puede decir que es el estudio de la microbiología en el pescado al natural. A partir del día 2 se observa un aumento del crecimiento de microorganismos, especialmente en la muestra control, que no tiene ningún recubrimiento que le proteja. Se observa que a día 7 es cuando más microorganismos hay. En esta figura se observa también que a día 7 el film que mejor propiedades antimicrobianas tiene es el formulado con alga Espagueti de mar, puesto que es aquel que mejor inhibe el crecimiento microbiano.

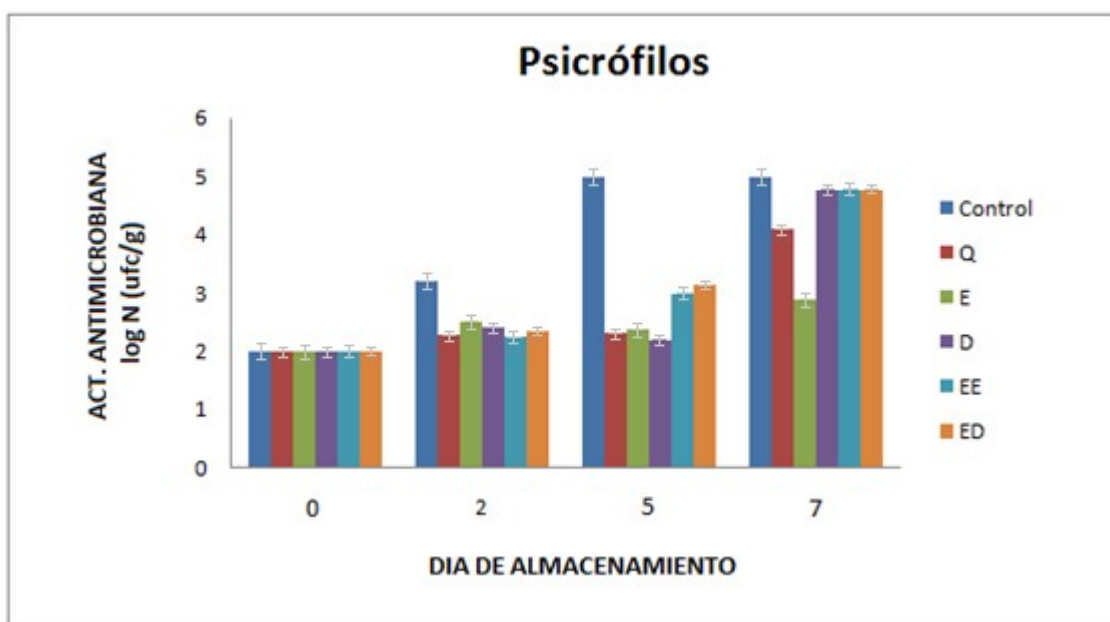


Figura 7: Crecimiento de organismos psicrófilos, en log N (ufc/g); a lo largo de los días de almacenamiento.

La figura 8 muestra el crecimiento de organismos mesófilos cultivados a 30 °C, a lo largo de los días de almacenamiento, para los diferentes recubrimientos utilizados. De nuevo, cabe destacar que a día 0 aún no ha comenzado a actuar el film por lo que se obtienen los mismos resultados para todos los tratamientos, siendo estos los resultados de estudiar la microbiología del pescado natural. Se observa que con los

días de almacenamiento hay un crecimiento de microorganismos, observándose un máximo el día 7. De nuevo el film que mejor funciona inhibiendo el crecimiento microbiano es el formulado con el alga Espagueti de mar.

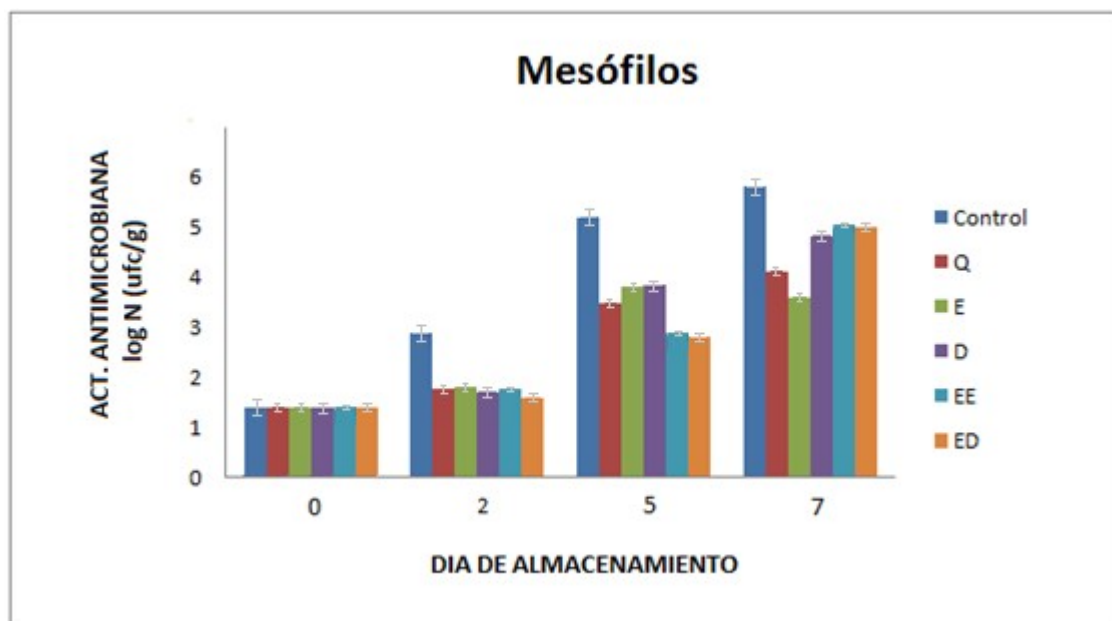


Figura 8: Crecimiento de organismos mesófilos, en log N (ufc/g); a lo largo de los días de almacenamiento.

En general hay un mayor crecimiento bacteriano en las muestras sin ningún tratamiento y se observa que el recubrimiento de Espagueti de mar es el que tiene un mayor control antimicrobiano. También se observa en ambos casos que el día 7 es cuando mayor crecimiento bacteriano hay, y esto se asocia a una pérdida de vida útil con el tiempo, tal y como era de esperar.

4.3.2. pH:

En este apartado cabe destacar en primer lugar que el pH del pescado varía cuando está vivo en función del agua donde vive y en el periodo post-mortem hay variaciones debido a factores que se estudian a continuación.

Con objeto de estudiar el efecto de los recubrimientos sobre la degradación de las hamburguesas, se determinó el pH de las distintas muestras tal y como se describe en el apartado 3.2.3.3. La tabla 3 descompone la variabilidad del factor pH en contribuciones debidas a varios factores que son: el número de repeticiones que se hacen, el tipo de recubrimiento que se usa, y el día de análisis. Se observa que tanto el tratamiento que le damos a la muestra con el film, como el almacenamiento a lo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

largo del tiempo, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre los valores de pH ($p < 0,05$).

Fuente	Valor-P
Efectos principales	
A: Repetición	0,0536
B: Tipo de recubrimiento	0,0074
C: Día de análisis	0,0008

Tabla 3: ANOVA del pH de las muestras.

En la tabla 4 se observan los valores del pH de las diferentes muestras y su desviación estándar. Se observa que la muestra con el film elaborado con el alga Dulce tiene los valores más bajos de pH y que la muestra sin film tiene los valores más altos. A priori pueden parecer valores poco significativos, pero cabe destacar que cada especie piscícola tiene unos valores determinados de pH, donde un pequeño aumento o disminución de este valor puede significar una alteración importante de sus propiedades.

	0	2	5	7
Control	6,56±0.03	6.55±0.03	6.54±0.03	6.56±0.03
Film Quitosano	6,56±0.03	6.55±0.03	6.51±0.03	6.53±0.03
Film alga Espagueti	6,56±0.03	6.54±0.03	6.46±0.03	6.46±0.03
Film alga Dulce	6,56±0.03	6.50±0.03	6.45±0.03	6.43±0.03
Film extracto Espagueti	6,56±0.03	6.52±0.03	6.49±0.03	6.50±0.03
Film extracto Dulce	6,56±0.03	6.51±0.03	6.48±0.03	6.53±0.03

Tabla 4: pH de todas las muestras en los diferentes días de análisis. En el día cero se estudia sólo una muestra que incluye todos los tratamientos.

La figura 9 marca una tendencia del pH con los días de almacenamiento, es una media de los valores obtenidos al medir el pH del pescado aplicándole los diferentes films. Se observa que a lo largo del almacenamiento en refrigeración hay una caída estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del pH, aumentando a partir del día 5. El aumento del pH a partir del día 5 se asocia a la descomposición de las proteínas del pescado y a la formación de compuestos básicos en el músculo durante el periodo post-mortem, (Arfat et al., 2015). Comienza a formarse trimetilamina por el deterioro bacteriano, amoníaco por la desaminación de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados volátiles que se asocian con el deterioro de productos pesqueros.

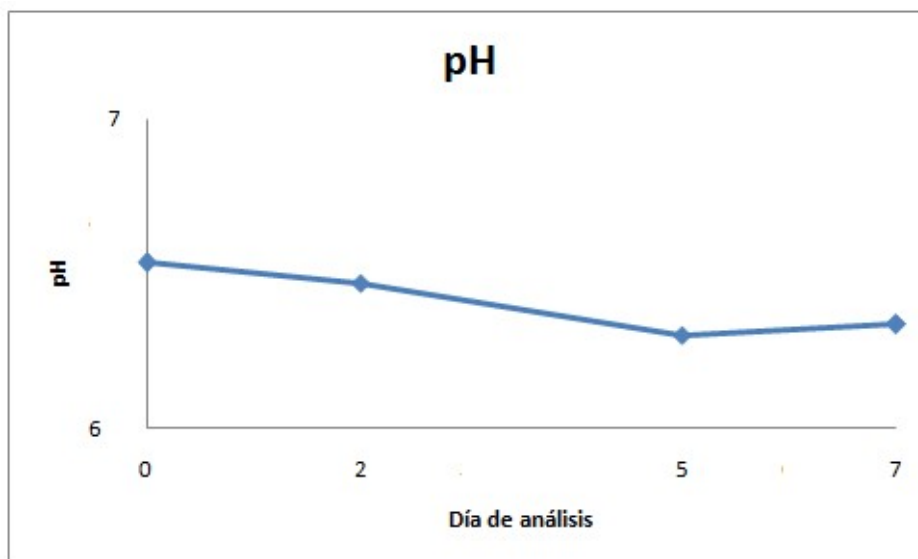


Figura 9: pH en función del día de análisis.

En la figura 10 se observa que el día 0 todas las muestras con los tratamientos tienen el mismo pH puesto que aún no ha actuado el recubrimiento, midiendo el pH del pescado al natural. A medida que avanza el almacenamiento se observa una disminución del pH y es a partir del día 5 cuando se comienzan a formar los compuestos básicos. Esta figura nos permite distinguir entre los diferentes tratamientos, siendo en el control en el que se produce un aumento más elevado, y manteniendo los films de algas el pH más bajo, es decir, impiden de manera más efectiva la formación de compuestos básicos y por tanto, la descomposición del pescado.

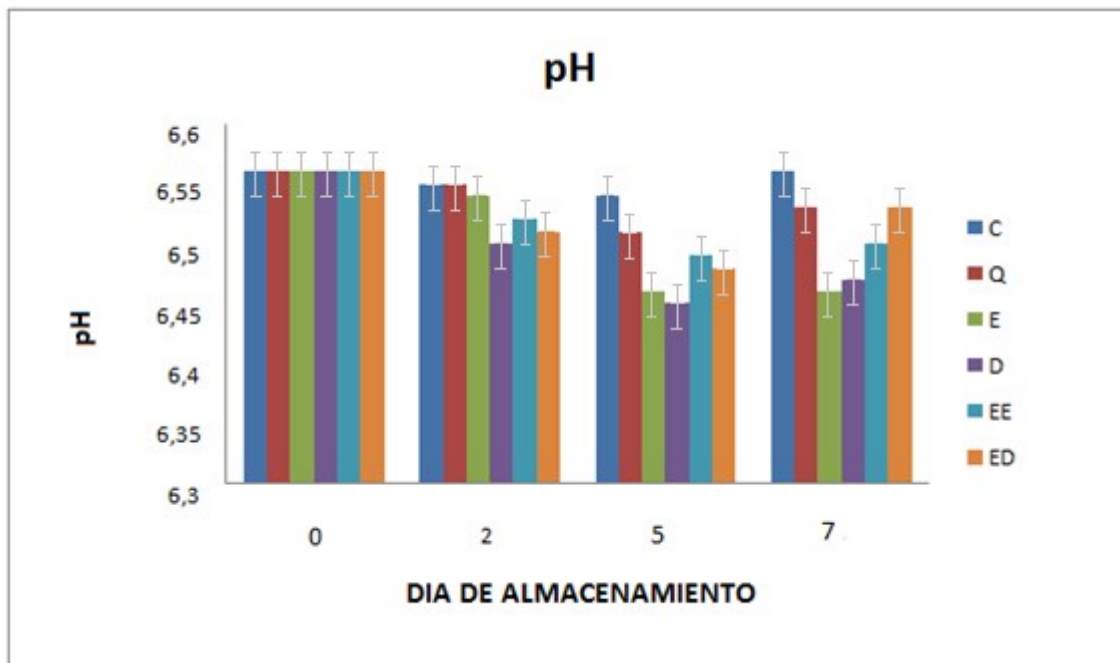


Figura 10: pH en función del día de almacenamiento y el tratamiento que se le da a las muestras. Recubrimiento de algas Dulse (D), Espagueti de mar (E), extracto de Dulse (ED), extracto de Espagueti de mar (EE) y quitosano (Q).

4.3.3. Actividad del agua

Dado que la actividad del agua juega un papel importante en el deterioro del pescado y en el crecimiento de microorganismos se investigó el efecto de los distintos recubrimientos en las muestras sobre la actividad del agua.

La actividad del agua se determinó como se describe en el apartado 3.2.3.4. Los resultados indican que tanto el almacenamiento de las hamburguesas de pescado a lo largo del tiempo, como la presencia o no de recubrimiento y su composición, afectan estadísticamente ($p < 0,05$) a los resultados con un 95% de nivel de confianza (Tabla 5).

Fuente	Valor-P
Efectos principales	
A: Repetición	0,0528
B: Tipo de recubrimiento	0,0138
C: Día de análisis	0,0004

Tabla 5: ANOVA de la actividad del agua de las muestras.

En la figura 11 se puede observar detalladamente este efecto de la actividad del agua en cada muestra y en los diferentes días.

Se observa que la actividad de agua aumenta significativamente en el último punto de muestreo. Con respecto a las diferencias entre los tratamientos, aquellos recubrimientos que presentan extractos de alga mostraron un control de actividad de agua ligeramente inferior respecto a cuándo se usan solo algas, especialmente en el caso del recubrimiento del alga Espagueti de mar, en el cual la actividad de agua es menor por lo que hay un mayor control. Por lo tanto, parece que el mayor control de actividad de agua se produce cuando tenemos el alga en los recubrimientos y esto afecta a la velocidad de deterioro del alimento, puesto que los altos valores de actividad de agua favorecen el crecimiento microbiano.

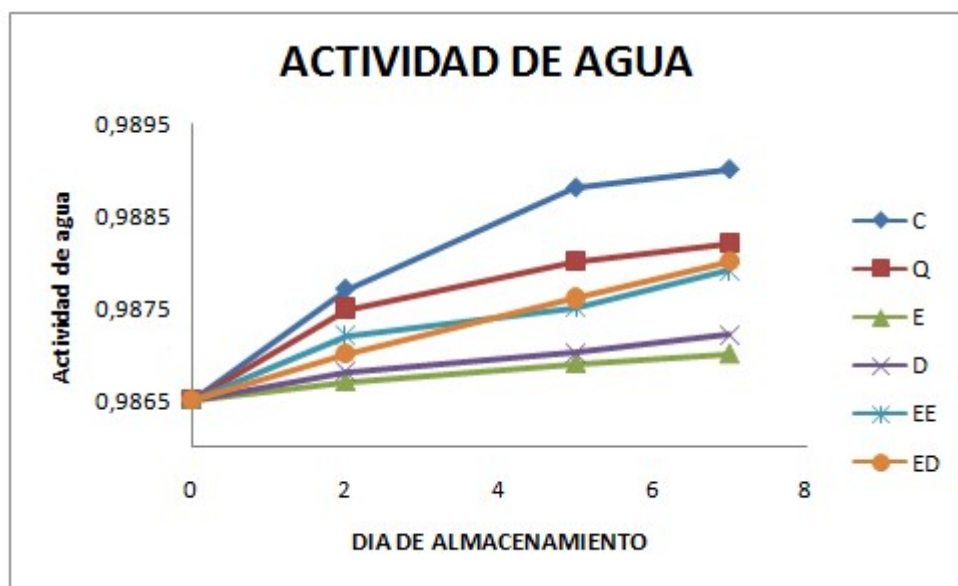


Figura 11: Actividad de agua en las diferentes muestras durante los diferentes días de análisis.

4.3.4. Estudio del color

El color es otro de los parámetros que se alteran con el deterioro del pescado. Por esta razón se estudiaron los cambios de color de las muestras con y sin recubrimientos durante los días de almacenamiento, utilizando un espectrofotómetro de reflectancia tal y como se describe en el apartado 3.2.3.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indican que el almacenamiento en refrigeración de las muestras a lo largo del tiempo, tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre el color de estas.

La figura 12 representa la luminosidad de las diferentes muestras en los diferentes tiempos de almacenamiento. Este parámetro se asocia con la oxidación de las muestras. Se observa una disminución de la luminosidad el último día de análisis, lo que estaría asociado con un aumento de la oxidación, especialmente en el pescado sin recubrimiento.

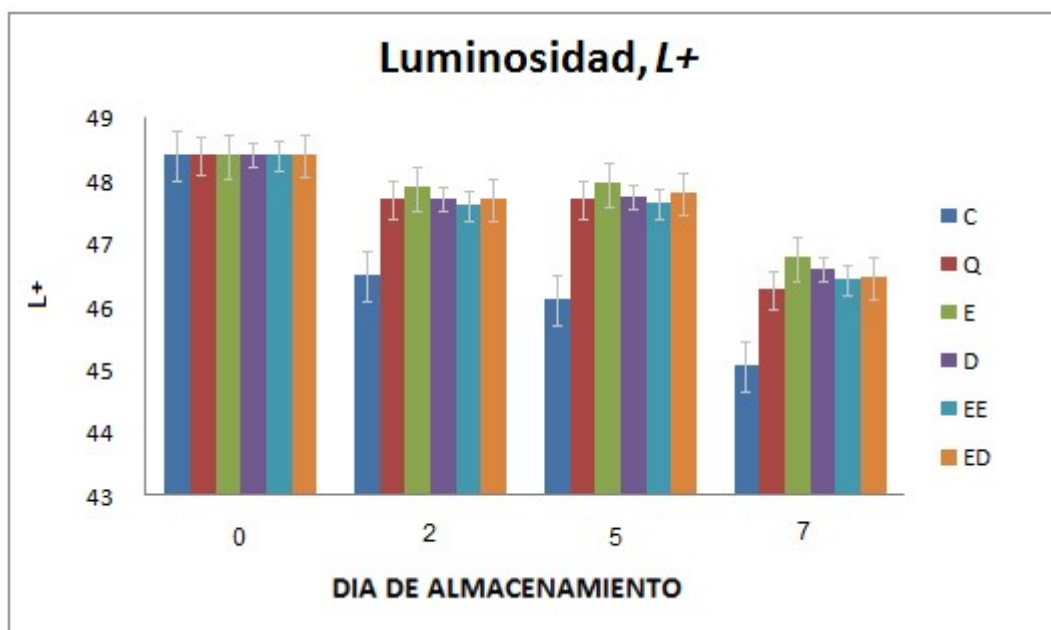


Figura 12: Color. Luminosidad en las diferentes muestras durante los días de análisis.

Las figuras 13 y 14 representan los valores de a y de b al principio del almacenamiento, día 0, y al final, día 7. El valor de a es el eje +rojo/-verde, los valores negativos son tonos verdes y los positivos tonos rojizos. El valor de b indica la coordenada de cromaticidad +amarillo/-azul, siendo los valores negativos los azulados y los valores positivos los tonos amarillentos. En el caso de la carne de trucha todos los valores son positivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

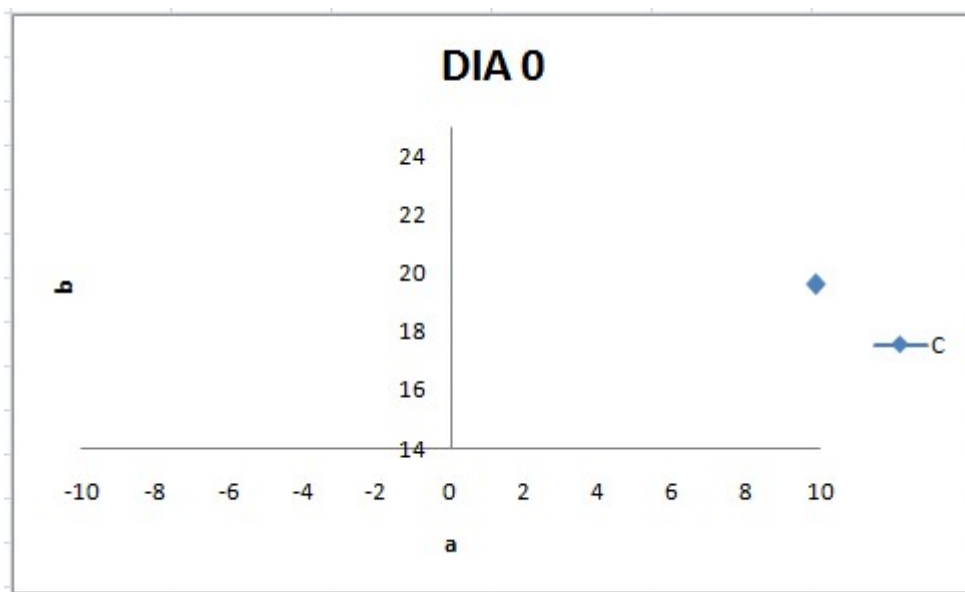


Figura 13: Color. Coordenas a y b en el día 0.

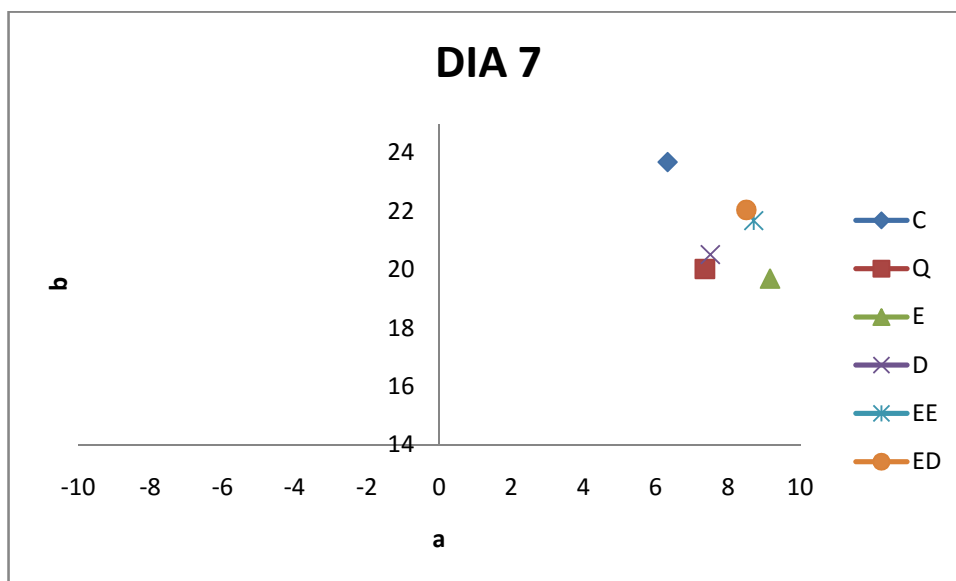


Figura 14:Color. Coordenadas a y b en el día 7.

Al principio del almacenamiento, se analiza la muestra sin que haya actuado el film y se observan valores positivos en torno a 10 en la coordenada a, verde/rojo; y valores en torno a 19,5 en la coordenada amarillo/azul. Durante el último día de análisis se observa que estos valores se ven afectados por la oxidación. A medida que

aumenta la oxidación el valor de a disminuye, de modo que los tonos rojizos son menos intensos. Y el valor de b aumenta con la oxidación de la muestra aumentando los tonos amarillentos.

En la figura 14 se observa que la muestra que más se ha oxidado al final del almacenamiento es la que no tiene film, C, puesto que a disminuye y b aumenta. En este sentido, la muestra que mejor conserva el color es aquella que tiene el film de Espagueti de mar puesto que mantiene los tonos rojizos (coordenada a) y los tonos amarillos, coordenada b, son los que menos se ven afectados.

4.3.5. Determinación de la oxidación lipídica (TBARS):

La oxidación lipídica juega un papel importante en el deterioro de los alimentos, que tiene como consecuencia las alteraciones en el aroma, sabor, color, la pérdida de determinados nutrientes y la formación de sustancias potencialmente nocivas.

En este trabajo se investigó la oxidación lipídica de las muestras con y sin recubrimientos, mediante el ensayo TBARS utilizando ácido tiobarbitúrico como reactivo tal y como se especifica en el apartado 3.2.3.6.

Los resultados indican que durante el almacenamiento se observa un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en el valor de TBARS expresado en μg de malonaldehído (MDA) por kg de músculo. El valor de TBARS es un indicativo de la oxidación lipídica, en el que se mide el contenido de MDA (Benjakul et al., 2012). El ataque del oxígeno al doble enlace de los ácidos grasos puede ser la causa de la iniciación de las reacciones de radicales libres en la oxidación de lípidos (Abdollahi et al., 2013). Los valores obtenidos al principio del almacenamiento estaban en torno a $47.234 \pm 0.049 \mu\text{g MDA/kg}$ muestra aumentando estos a los 7 días de almacenamiento.

Los films actúan como barrera al oxígeno de modo que sólo una pequeña cantidad de oxígeno puede entrar en contacto con las muestras disminuyendo la oxidación.

Los productos secundarios de la oxidación se acumulan y el valor de TBARS aumenta a lo largo del tiempo de almacenaje como se observa en la figura 15:

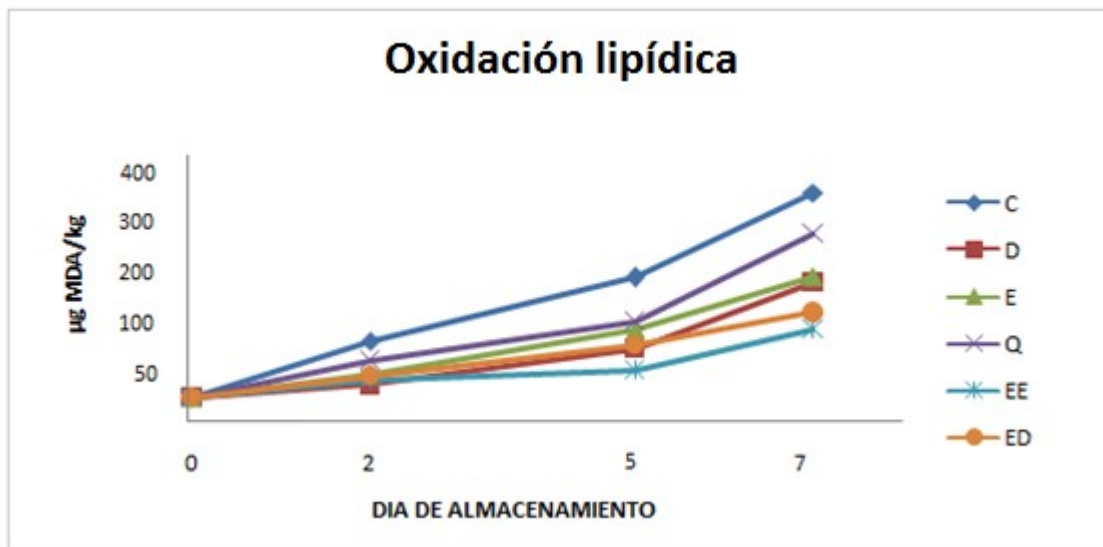


Figura 15: TBARS. Aumento de la oxidación lipídica con los días de almacenamiento

También se observa cómo durante el almacenamiento hay un mayor aumento de los peróxidos en las muestras sin recubrimiento en comparación con el resto de muestras ($p < 0,05$). Parece que los recubrimientos actúan creando una capa resistente al oxígeno en la superficie del pescado y gracias a esto disminuye la oxidación de lípidos (Tihminlioglu et al., 2010).

Por tanto, los resultados indican que la oxidación de lípidos puede ser retardada cuando incorporamos un recubrimiento a las muestras de pescado, especialmente si combinamos el quitosano con los extractos de alga, que parece que funcionan reduciendo la permeabilidad al oxígeno.

Se observa que en el caso de la oxidación de lípidos actúan mejor los recubrimientos de los extractos. Esto puede ser debido a que los extractos solo presentan como compuestos antioxidantes mayoritariamente fenoles mientras que el film de alga presenta polímeros y otros compuestos que pueden afectar a los procesos oxidativos, y favorecer reacciones enzimáticas, microbiológicas, etc que afectan al resultado.

4.3.6. Determinación de la oxidación proteica (Carbonilos):

Este método de determinación de oxidación de proteínas se realiza tal y como se ha explicado en el apartado 3.2.3.7. Tiene lugar un aumento en la formación de

carbonilos a lo largo del almacenamiento que puede ser un indicativo de que está teniendo lugar la oxidación proteica.

En la figura 16 se observa que con los días de almacenamiento se produce un aumento en la formación de carbonilos a consecuencia de la oxidación de proteínas del pescado. El recubrimiento que tiene mayor efectividad en la inhibición de esta formación de carbonilos es el del alga Espagueti de mar, y esto puede estar relacionado con el contenido en fenoles puesto que se ha determinado que los compuestos fenólicos inhiben la oxidación de proteínas debido a los enlaces de estos con las proteínas o la formación de complejos con ellas (Siebert et al., 1996).

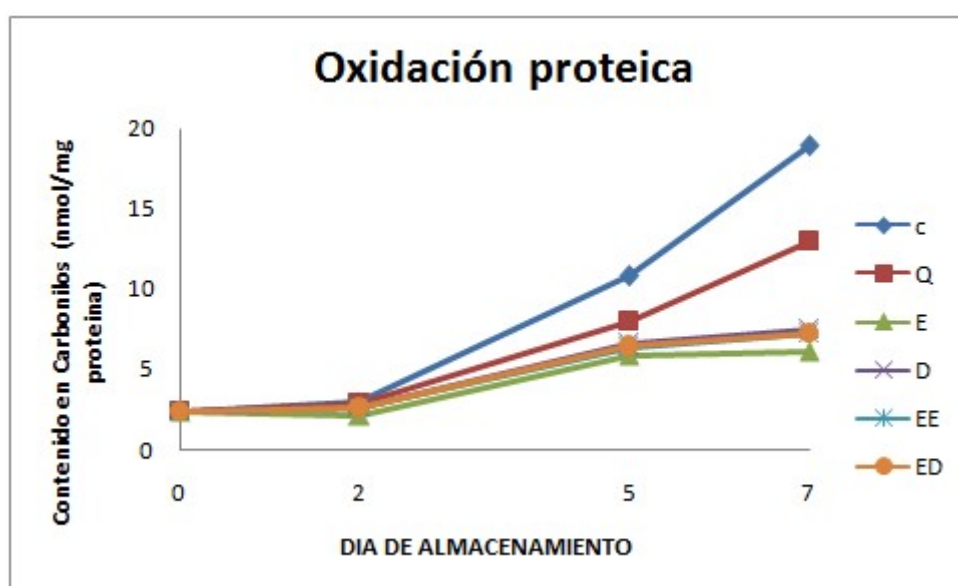


Figura 16: Representación de la oxidación proteica mediante el contenido en carbonilos durante los diferentes días de almacenamiento.

4.3.7. Estudio del poder antioxidante:

Se realiza tal y como se describe en el apartado 3.2.3.8.

Una vez que las hamburguesas de pescado se conservan en refrigeración con los diferentes films, se realiza el estudio del poder antioxidante del pescado. Para ello es necesario hacer las extracciones de la carne con metanol y acetona.

Durante el ensayo ORAC, que se trata de enfrentar a las muestras con el radical APPH, se observa un decrecimiento de la intensidad de la fluorescencia debido al poder antioxidante de las muestras. La curva de calibrado ha sido obtenida

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

representando el área bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína frente a las concentraciones conocidas de trolox 120, 90, 60, 15 y 7,5 μM dando como resultado la ecuación: $y=8764,122x + 56681,974$ con un buen coeficiente de correlación ($r^2=0.995$). Los resultados obtenidos se han expresado en μM Trolox equivalente por gramo de muestra. Se ha observado cómo afecta la presencia de un film en las muestras, siendo las muestras con film las que tienen mayor poder antioxidante. Al final del almacenamiento el poder antioxidante que mejor se ha conservado es el de las muestras con los recubrimientos de extracto de algas. Figura 17:

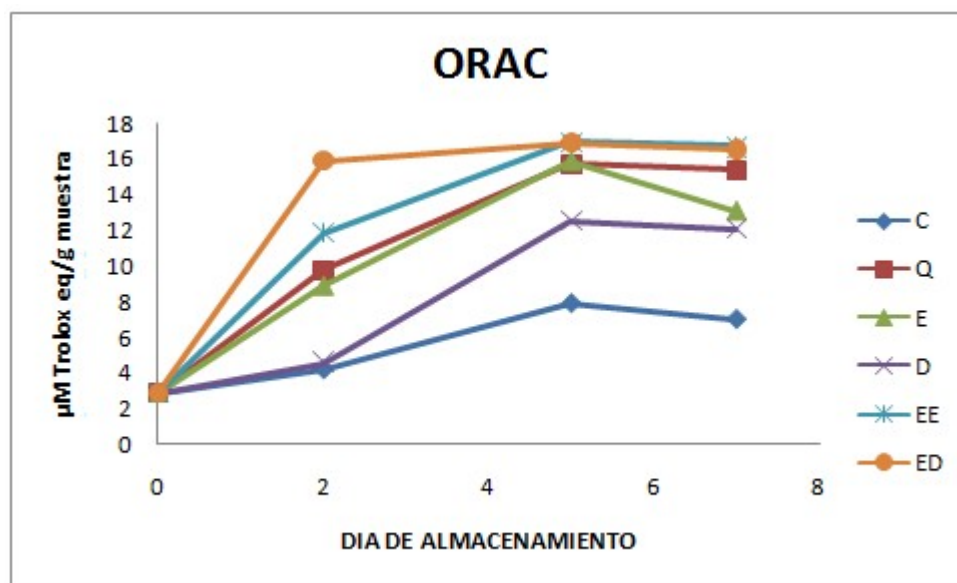


Figura 17: ORAC de las muestras con los diferentes recubrimientos: control (C), alga Dulce (D), alga Espagueti de mar (E), extracto de Dulce (ED), extracto de Espagueti de mar (EE) y quitosano (Q).

Durante el ensayo de TEAC se mide el decrecimiento de la absorbancia por el consumo del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$. La ecuación obtenida en la curva de calibrado fue: $y=-0,0019x+0,5361$ con un buen coeficiente de correlación ($r^2=0.9991$). Los resultados se expresan también en μM equivalentes de Trolox por gramo de muestra. Se observa de nuevo que las muestras con mayor poder antioxidante son aquellas que tienen un film de extracto de alga, en especial del alga D. Figura 18:

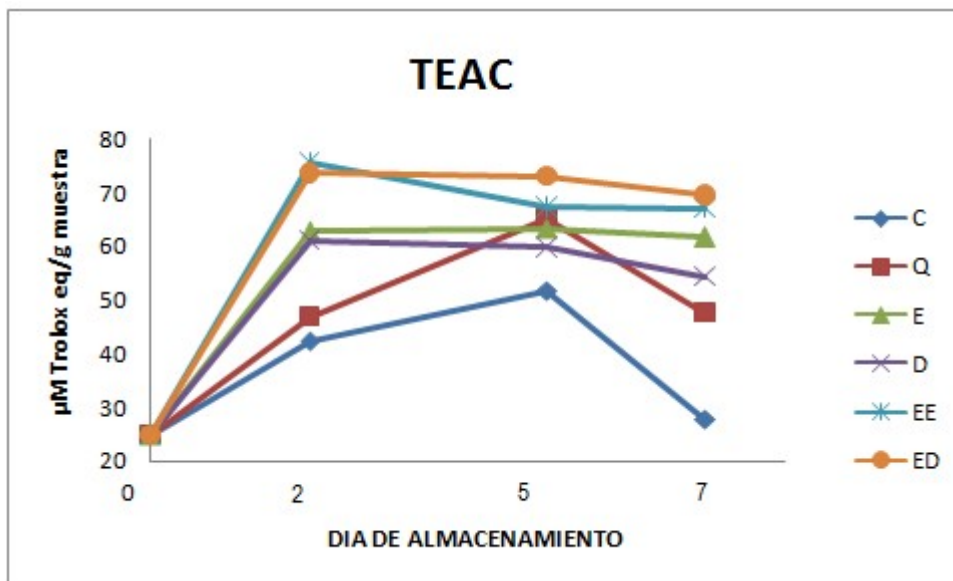


Figura 18: TEAC de las muestras con diferentes recubrimientos: control (C), Recubrimiento de algas Dulse (D), Espagueti de mar (E), extracto de Dulse (ED), extracto de Espagueti de mar (EE) y quitosano (Q).

La actividad antioxidante con el ensayo de atrapamiento de radicales DPPH se evaluó de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1.5. El DPPH es un radical estable, de color azul, que puede aceptar protones donados por entidades antioxidantes y convertirse de este modo en su forma no radicalaria y no coloreada. De esta forma hay una relación directa entre la decoloración de la solución y las propiedades antioxidantes del extracto.

La tabla 6 muestra el porcentaje de inhibición del radical DPPH. Todas las muestras analizadas tienen elevada capacidad antioxidante con porcentajes de inhibición mayores del 50%. Los recubrimientos de algas presentan valores significativamente superiores ($p < 0,05$) respecto a los recubrimientos formulados con los extractos del alga y quitosano.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	0	2	5	7
Control	57,24	52,67	52,89	54,99
Recubrimiento quitosano	57,24	54,09	54,89	60,55
Recubrimiento espagueti de mar	57,24	64,17	67,16	65,38
Recubrimiento dulce	57,24	61,97	67,11	66,99
Recubrimiento extracto espagueti de mar	57,24	53,69	54,11	56,81
Recubrimiento extracto Dulce	57,24	56,16	53,41	55,61

Tabla 6: DPPH de las muestras con y sin film expresado en % de inhibición.

También se estudiaron los métodos fenoles y FRAP pero los resultados obtenidos no se pueden interpretar debido a que la señal de la absorbancia es muy baja. Esto se debe a que el disolvente utilizado no ha sido el correcto para estas muestras y habría que optimizar el método para continuar con esta investigación.

5. CONCLUSIONES:

- i. Desde el punto de vista de la microbiología se observa que se conservan mejor las hamburguesas de pescado que tienen un film con respecto a aquellas que no lo tienen. A pesar de que en el último día de análisis hay un aumento de actividad microbiana generalizado, este es menor en las hamburguesas con film. Gracias a estos resultados se puede concluir que sería viable una revisión de las temperaturas aplicadas a procesos de almacenamiento y de transporte.
- ii. A la hora de estudiar el pH se observa que la formación de compuestos básicos que descomponen el pescado son más notables en el pescado sin recubrimiento y que los films con alga son los que más impiden la descomposición.
- iii. Si se estudia la actividad de agua se concluye que hay un aumento significativo de esta en las muestras sin recubrimiento, permitiendo de este modo el crecimiento de microorganismos que producen el deterioro de las hamburguesas. Parece que el film que mejor efecto tiene sobre la actividad de agua es el del alga Espagueti de mar.
- iv. Se observa que se mantiene mejor el color de la muestra cuando se utiliza un recubrimiento, conservando el color inicial sin degradarse a tonalidades rojizas que denotan oxidación del producto.
- v. En cuanto a su poder antioxidante se observa que el pescado se conserva mejor cuando tiene un film respecto a cuando no lo tiene. Tanto el método ORAC como el método TEAC muestran resultados parecidos en cuanto a qué film tiene mayor poder antioxidante siendo los recubrimientos de extractos de algas los que actúan mejor en cuanto a poder antioxidante.
- vi. La oxidación de lípidos y proteínas aumenta en el último día de análisis. En el caso de la oxidación de lípidos se observa que el film del extracto de Espagueti de mar actúa mejor creando una barrera resistente al oxígeno para evitar esta oxidación. Esto puede ser debido a que los extractos sólo contienen compuestos antioxidantes mayoritariamente fenólicos mientras que el film de alga presenta polímeros y otros compuestos que pueden afectar a los procesos oxidativos a través de reacciones enzimáticas o microbiológicas.

CONCLUSIONES

Puesto que el pescado tiene una vida útil muy baja, asociada a la elevada concentración de grasas poliinsaturadas que presenta, se recomienda la incorporación de films para poder aumentar su vida útil y la actividad antioxidante del producto final. Por tanto, el producto desarrollado es un alimento potencialmente funcional.

Como conclusión final cabe destacar que este proyecto innovador ha resultado muy positivo para la conservación de alimentos utilizando nuevas tecnologías que no afectan a su sabor, a su temperatura y además consigue mantener los nutrientes del pescado, que como se ha dicho anteriormente son muy numerosos. Además han sido elaborados con algas, una materia prima renovable y muy saludable.

En investigaciones posteriores, vale la pena investigar más a fondo las propiedades mecánicas de los films para hacer un estudio más detallado de su permeabilidad y propiedades elásticas, y así como de las diferentes proporciones de estas algas y extractos para optimizar este estudio.

(V) Referencias bibliográficas:

Abdollahi M., Rezaei M., Farzi G., (2013). Influence of chitosan/clay functional bionanocomposite activated with rosemary essential oil on the shelf life of fresh silver carp. *Food Science Technology* 49: 811-818.

Arfat Y.A., Benjakil S., Prodpran T., Osako K. (2015) Development and characterization of blend films based on fish protein isolate and fish skin gelatin. *Food Hydrocoll* 39: 58-67.

Benjakul S., Ahmad M., Sumpavapol P., Nirmal N.P., (2012) Quality changes of sea bass slices wrapped with gelatin film incorporated with lemongrass essential oil. *Food Microbiology* 155: 171-178.

Badui D.S., (1993). *Química de los alimentos*. Tercera edición. Pearson Educación. 213-232.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology* 28: 25–30.

Campos C.A., Gerchenson L.N., Flores S.K. (2010). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technology* 4: 849-875.

Cao G., Alessio H.M., Cutler R.G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical and Biology Medicine* 14: 303–311.

Debeaufort F., Quezada-Gallo J.A., Voilley A. (1998). Edible films and coatings: Tomorrow's packallings: a review. *Critical reviews in Food science and Nutrition*, 38: 299-313.

García Casal M.N. (2007). La alimentación del futuro: Nuevas tecnologías y su importancia en la nutrición de la población. *Anuales Venezolanos de Nutrición Vol* 20(2):108-114.

Gayán E., Torres J.A., Paredes-Sabia D. (2012). Hurdle approach to increase the microbial inactivation by High Pressure Processing: Effecto of essential oils. *Food engineering Reviews* 4:141-148.

Hosseini M.H., Razavi S.H., Mousavi S.M., Yasaghi S.A. y Hasansaraei A.G. (2008). Improving antibacterial of edible films based on chitosan by incorporating thyme and clove essential oils and EDTA. *Journal of Applied Sciences* 8: 2895-2900.

Hosseini M.H., Razavi S.H., Mousavi M.A. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *Journal of Food Processing and Preservation* 33:727-743.

Hussain A.I., Anwar F., Przybylski R. (2008) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem* 108 (3):986-995.

- Ignat, I., Volf I. Popa V.I., (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 126: 1821-1835.
- Jirovetz L., Buchbauer G., Stoilova I., Stoyanova A., Krastanov A., Schmidt E. (2006). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6303-6307.
- Kester J.J., Fennema O.R. (1986). Edible Films and Coatings. *Food technology (USA)* Vol 40: 47-51.
- Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. (1994). Carbonyls assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*, 233: 346-357.
- Maftoonazad N., Badii F. (2009). Use of edible films and coatings to extend the shelf life of food products. *Recent Pat Food Nutrition Agriculture* 1(2): 162-170.
- Martinaud A., Mercier Y., Marinova P., Tassy C., Gatellier P., Renner M., (1997). Comparison of Oxidative Processes on Myofibrillar Proteins from Beef during Maturation and by Different Model Oxidation Systems. *Journal of agricultural and food chemistry* 45(7): 2481-2487.
- Ojagh S.M., Núñez-Flores R., López-Caballero M.E., Montero M.P. y Gómez-Guillén M.C., (2011). Lessening of high-pressure-induced changes in Atlantic salmon muscle by combined use of a fish gelatine-lignin film. *Food Chemistry* 125: 595-606.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307-315.
- Pastor, M. (2005). Cultivo del Olivo con Riego Localizado. Coedición Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, y Ediciones Mundi-Prensa: 783.
- Pawlowska-Goral , Kurek-Gorecka A.M., Sobczak A., Rzapeccka-Stojko A., Gorecki M.T., Wardas M. (2012). Antioxidant Activity of Ethanolic Fractions of Polish Propolis. *Ezeitschrift fur naturforschung section C-A Journal of bio sciences* 67:11-12.
- Ruiz-Navajas Y., Viuda-Martos M., Sendra E., Pérez-Álvarez J.A., Fernández-López J. (2013). In Vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control* 30: 386-392.
- Sánchez-González L., Pastor C., Vargas M., Chiralt A., González-Martinez C., Cháfer M. (2011) Effect of hydroxypropylmethyl cellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biol Technol* 60(1):57-63.
- Senser F. y Scherz H. (1999). Tablas de composición de alimentos: el pequeño Souci-Fachmann-Kraut. Editorial Acirbia. Zaragoza. España: 430.
- Siddhuraju P., Becker K., (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Agriculture food chemistry* 9: 2144-55.

Sieber K.J., Troukhanova N.V, Lynn P.Y. (1996). Nature of polyphenol-proteins interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 80-85.

Tihminioglu F., Aktiok D, Altiok E., (2010). Physical, Antibacterial and Antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of material Science: Materials in medicine* 21: 2227-2236.

Turhan S., Sahir I., Temiz H., (2009). Oxidative stability of brined anchovies with plant extracts. *Food science technology* 44(2):386-393.

Villarino A.L., Moreno P., Ortuño I. (1999). Valor nutritivo del pescado. *Nutrición y Salud*; Editorial Nueva Imprenta, S.A.: España; pp 51–66.

(VI) Referencias web:

AECOSAN, Agencia Española de consumo, seguridad alimentaria, y nutrición:
<http://www.aecosan.msssi.gob.es/>

EUROSTAT, Estadísticas Europeas: <http://ec.europa.eu/eurostat>

Norma Española UNE ISO 4833 (Mayo 2003).