

Facultad de Ciencias Exactas

Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos



*“Estudio de harinas de algas marinas comestibles y su
incorporación en productos cárnicos”*

Nadia Florencia Nagai

Directora: Dra. Silvina C. Andrés

Co-Directora: Dra. Natalia Ranalli

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)

AGRADECIMIENTOS

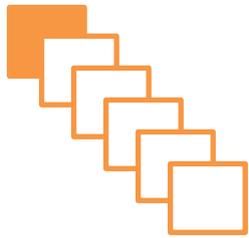
- A la UNLP por darme todas las herramientas necesarias para adquirir los conocimientos que me permitieron llegar hasta acá y al CIDCA, por brindarme el espacio y todos los recursos para poder realizar este trabajo.
- A Naty y Silvina, por recibirme en su grupo de trabajo y darme la oportunidad de trabajar siempre codo a codo con ustedes. Gracias por su paciencia, su dedicación desde el primer día, su total compromiso, y principalmente por el cariño y los buenos momentos dentro del laboratorio. Son ambas excelentes personas.
- A mi familia, por enseñarme buenos valores y confiar en mí, porque nunca dejaron que mis sueños se derrumben y me apoyaron siempre en todo momento. Gracias por el esfuerzo que hicieron y hacen por mí, y por nunca alejarse de mi lado, teniendo siempre las palabras justas para seguir y nunca caer.
- A mis amigas de Misiones, que son desde el primer momento un apoyo enorme en todo este camino. Gracias por su amistad incondicional, por ser mis hermanas del corazón que siempre están al pie del cañón, y por ayudarme a demostrar al mundo que la amistad verdadera trasciende cualquier distancia.
- A mi amiga Noelia, por estar en mi vida hace años, compartiendo muchas horas de risas juntas y por elegirme madrina de Josephina, dejándome formar parte de su familia.
- A Fran, mi compañero de vida, por su infinita ternura y por siempre darme mucho amor, compañía y apoyo. Estoy feliz de habernos encontrado en el mismo camino. Gracias a vos y a Gaby, Carlitos y Juli por abrirme las puertas de su hermoso hogar y dejarme ser parte de una gran familia.
- A mis amigas de la facu, Dolo, Mari A., Marti, Flor, Luli, Ro, Mari D., y Na, que son sin duda lo mejor que me llevo de esta etapa, nada hubiese podido ser mejor sin ustedes a mi lado.
- A Agus, mi compañera desde el curso de ingreso, por compartir más mates y risas que horas de estudio. ¡Toda una carrera juntas hasta el final! Gracias por ser mi compañera fiel y por estar siempre en las buenas y en las no tanto también.
- A los chicos del laboratorio, Gabriel, Nati A., Lucas, Sol, Alan, Lau y Noe, que hacen del lugar de trabajo un espacio hermoso, ameno y de buenos momentos.

ÍNDICE

1. Introducción	
1.1 Las algas	1
1.2 Producción mundial de algas	2
1.3 Las algas marinas como alimentos: situación actual y legislación	2
1.4 Composición nutricional de las algas	4
1.4.1 Proteínas	4
1.4.2 Lípidos y ácidos grasos	5
1.4.3 Minerales	6
1.4.4 Polisacáridos	7
1.4.5 Otros componentes minoritarios	10
1.5 Propiedades tecnológicas	12
1.6 Capacidad antioxidante	13
1.7 Propiedad antimicrobiana	14
1.8 Algas en el desarrollo de alimentos cárnicos	15
1.9 La hamburguesa	16
1.10 Reformulación de productos cárnicos	17
2. Objetivos	
2.1 Objetivos generales	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. Materiales y Métodos	
PARTE I: Estudio y caracterización de harinas de algas marinas comestibles	
3.1 Materias primas	23
3.2 Determinaciones realizadas	23
3.2.1 Actividad acuosa	23
3.2.2 Tamaño de partícula	24
3.2.3 Parámetros físicos-químicos	25
I. Capacidad de retención de agua y de aceite	25
II. Grado de hinchamiento	26
3.2.4 Composición centesimal	26
I. Determinación de humedad	26
II. Determinación de cenizas totales	27

III. Determinación de proteínas	27
IV. Determinación del contenido lipídico y perfil de ácidos grasos	28
V. Determinación de hidratos de carbono totales	29
VI. Determinación de fibra dietaria total	30
3.2.5 Determinación cuantitativa de clorofilas y carotenoides	31
3.2.6 Determinación de polifenoles totales	31
3.2.7 Determinación de la capacidad antioxidante	32
I. Ensayo de DPPH•	32
II. Ensayo de ABTS•+	33
PARTE II: Aplicación de las harinas de algas marinas en productos cárnicos	
3.3 Materias primas	35
3.4 Diseño experimental	35
3.5 Elaboración de las hamburguesas	36
3.6 Almacenamiento congelado	37
3.7 Determinaciones realizadas durante el almacenamiento congelado	37
3.7.1 Rendimiento	37
3.7.2 Encogimiento	38
3.7.3 Jugosidad por presión	38
3.7.4 Análisis de perfil de textura (TPA)	38
3.7.5 Color	40
3.7.6 Oxidación lipídica	41
3.8 Otras determinaciones realizadas	42
3.8.1 Recuentos microbianos	42
3.8.2 Determinación de la capacidad antioxidante	44
3.8.3 Contenido lipídico y perfil de ácidos grasos	44
3.9 Análisis estadístico	44
4. Resultados y Discusión	
PARTE I: Estudio y caracterización de harinas de algas marinas comestibles	
4.1 Actividad acuosa	45
4.2 Tamaño de partícula	46
4.3 Composición centesimal	48
4.4 Clorofilas y carotenoides	54

4.5 Polifenoles totales	55
4.6 Capacidad antioxidante	57
4.7 Determinación de parámetros físico-químicos	60
PARTE II: Aplicación de las harinas de algas marinas en productos cárnicos	
4.8 Parámetros de calidad: Rendimiento, jugosidad y encogimiento de hamburguesas	64
4.9 Análisis de Perfil de Textura	67
4.10 Color	72
4.11 Capacidad antioxidante en la matriz cárnica	74
4.12 Oxidación lipídica	75
4.13 Recuentos microbianos	78
4.14 Características nutricionales - Contenido de lípidos y perfil de ácidos grasos de hamburguesas	81
5. Conclusiones	86
6. Bibliografía	89



1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las algas

El entorno marino es muy diverso y ofrece una amplia variedad de aplicaciones con numerosas áreas potenciales de explotación. Las algas son una de las fuentes más ricas y prometedoras de recursos naturales renovables aún no utilizados en gran escala por el hombre (Cofrades y col., 2013) que pueden aplicarse en muchos aspectos tales como fertilizantes, en cosmética, medicina, en el área farmacéutica y en alimentos (Boraso, 2003).

El término “alga” se aplica a aquellos organismos autótrofos (es decir, que realizan fotosíntesis) cuya vida se desarrolla ligada al agua dulce o salada y que no desarrollan flores ni cuentan con sistema vascular desarrollado. Las algas ocupan el primer eslabón de la cadena alimenticia en el ambiente acuático y pueden vivir en dos condiciones muy distintas: las **algas plantónicas** que son aquellas que forman parte del fitoplancton y viven libres en la masa de agua y las **algas bentónicas** que crecen adheridas a rocas u otros sustratos.

Las algas marinas bentónicas, que viven sobre los fondos marinos, pertenecen a tres divisiones que se diferencian principalmente por el tipo de pigmentos predominantes:

- i. División *Chlorophyta* (algas verdes): Algunas son unicelulares, pero la mayoría de las especies marinas son macroalgas. Si son pluricelulares se pueden organizar formando talos de aspectos muy diferentes: filamentosos simples o ramificados, laminares o cenocíticos.
- ii. División *Phaeophyta* (algas pardas): Son siempre pluricelulares y prácticamente marinas en su totalidad, presentan desde pequeños talos filamentosos microscópicos hasta los enormes tamaños de las grandes algas que forman bosques bajo el nivel del mar. Pueden medir desde 30 cm hasta 20 m de alto.
- iii. División *Rhodophyta* (algas rojas): Hay unas pocas especies unicelulares ya en su mayoría son pluricelulares. De las cuatro divisiones de algas marinas, ésta es la que alcanza mayor variedad en cuanto a diversidad en la estructura de sus talos. Generalmente oscilan entre unos pocos centímetros y alrededor de un metro de longitud.

1.2 Producción mundial de algas

Las algas marinas tienen importantes funciones biológicas, ambientales y económicas en el ecosistema costero (Brijesh y Declan, 2015). El cultivo de plantas acuáticas, mayoritariamente de algas marinas, ha crecido rápidamente y actualmente se practica en unos 50 países (FAO 2016). Creció un 8% anual durante el decenio 2005-2015, cifra superior al 6,2% del decenio precedente, y la producción durante este período se duplicó con creces.

Según el informe de la FAO 2016 “El estado mundial de la pesca y la acuicultura” en el año 2014 se cultivaron 28.5 millones de toneladas de algas marinas y otras para consumo directo o para la ulterior elaboración de alimentos (tradicionalmente en Japón, Corea y China) o para utilizarlas como fertilizantes y con fines farmacéuticos o cosméticos, entre otros. Las algas marinas llevan mucho tiempo siendo utilizadas para alimentar al ganado y en medicina, por ejemplo, para tratar la carencia de yodo y como vermífugo. Se procesan industrialmente para extraer espesantes como el alginato, el agar y la carragenina o se utilizan, normalmente en forma de polvo seco, como aditivo en los alimentos para animales. Cada vez se está prestando mayor atención al valor nutricional de varias especies de algas marinas, debido a su alto contenido de vitaminas, minerales y proteínas. Están saliendo al mercado numerosos alimentos y bebidas con sabor a algas (incluso helados), cuyo principal mercado es la región de Asia y el Pacífico, pero también aumenta el interés en Europa y América (FAO, 2016).

En Argentina, las macroalgas son recursos renovables del Mar Argentino y según el informe de la FAO, “Perspectivas para la industria de las algas marinas”, se han propuesto varios proyectos con diferentes fines, los cuales incluyen desarrollar el cultivo de *Gracilaria* sp. para la producción de agar, producir carragenina utilizando *Gigartina skottsbergii* y *Sarcothalia crispata* presentes en la provincia de Santa Cruz, y la preparación de alimentos para el consumo humano a partir de *Porphyra columbina* (nori), *Monostroma undulatum* (nori verde) y *Undaria pinnatifida* (wakame), las cuales son especies altamente consumidas en los mercados asiáticos (Japón, Corea y China, entre otros).

1.3 Las algas marinas como alimentos: situación actual y legislación

El consumo de productos de origen marino siempre ha sido de gran interés y está ganando cada vez más atención, ya que las personas se vuelven más conscientes de la relación entre la dieta y la salud (Roohinejad y col., 2016). Hoy en día, se han desarrollado

y comercializado muchos productos de origen marino nuevos, que ofrecen beneficios para la salud y la posibilidad de disminuir el riesgo de algunas enfermedades. La venta de tales alimentos ha aumentado significativamente en Europa y en otras partes del mundo (Annunziata y Vecchio, 2011). Además, los alimentos de origen marino y sus ingredientes, como aceites, y proteínas de pescado, péptidos bioactivos, algas marinas (macroalgas y microalgas) se pueden agregar a diferentes productos alimenticios como cárnicos, lácteos, pescado o productos vegetales para darles valor agregado (Jiménez-Colmenero, 2007).

En culturas del pacífico (Indonesia, Filipinas, Hawaii, Nueva Zelanda) y de Asia (China, Japón, Corea), **las algas** han sido consumidas desde la antigüedad en una amplia variedad de platos como ensaladas, sopas, galletas, postres y condimentos (McHugh, 2003; Yuan, 2007). En Islandia, Gales, Francia y en algunos estados de Canadá y los Estados Unidos, también existe un consumo tradicional de alimentos a base de algas que varía en importancia según el país y las regiones, pero que en general es menos importante que en Asia (Chopin, 2015; Yuan, 2007).

En la actualidad, según informe FAO 2016 en el balance de alimentos no se incluyen las algas. Sin embargo, una parte importante de la producción se consume como alimento en diversas culturas, especialmente en Asia. Por ejemplo, en Japón, el alga roja, nori (*Pyropia* y *Porphyra*), es una envoltura tradicional para sushi y se utiliza en sopas. Además, las algas marinas wakame (*Undaria pinnatifida*), laminaria del Japón (*Laminaria/Saccharina japonica*) y mozuko (*Nemacystus* spp.) se cultivan como alimento.

En la Argentina, el Código Alimentario Argentino admite a las algas como producto alimenticio y en el Artículo 923 del Capítulo XI (Alimentos vegetales) define a las algas como “tejidos celulares frescos o secos de las plantas marinas, constituidos por células redondeadas o cilíndricas semejantes entre sí, que se reúnen para formar tejidos como los parenquimatosos. Las algas comestibles son únicamente las macroscópicas y en particular las variedades de *Porphyra*, *Rhodophytas*, *Laminaria*, *Fucus*, *Macrocystis*, *Chondrus*, *Gracilaria*, *Clopterox*, entre otras. Las que se expendan desecadas no deberán tener un contenido acuoso superior al 15%”.

La aplicación de las algas en Argentina se podría agrupar en 3 conjuntos: a) energético; b) industrial y c) alimentario. Con respecto a éste último, el consumo directo de este tipo de alimento en nuestro país es prácticamente desconocido debido a los recursos agrícolas ganaderos que posee, los cuales resultan muy competitivos frente a los productos del mar, además de razones costumbristas e históricas que, como la mayor parte de los países occidentales, hacen que esta clase de alimentos no forme parte de la dieta corriente. No

obstante, han aparecido algunos productos nacionales, especialmente harina de *Porphyra*, que se comercializa en muy pequeña escala y se consumen como productos dietéticos. (Asensi, 1981). Asimismo, recientemente se ha desarrollado una pasta alimenticia con algas del Golfo San Jorge, enmarcado en el proyecto “Elaboración de fideos secos con algas, recurso de la costa patagónica argentina” de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, con el fin de lograr un alimento de mayor valor agregado y utilizar un recurso de la costa patagónica argentina que no es explotado en la actualidad para tal fin.

Sin embargo, si bien el consumo directo no es mucho, son innumerables los productos que contienen hidrocoloides provenientes de algas marinas, sobre todo agar, carragenanos, alginatos, etc., los cuales actúan sobre todo como gelificantes, emulsificantes y estabilizantes en alimentos de uso corriente como flanes, mermeladas, salsas, productos lácteos, pastelería, etc. (Asensi, 1981).

1.4 Composición nutricional de las algas

Los constituyentes nutricionales de las algas, incluyendo los macronutrientes (como proteínas y minerales) y micronutrientes (como por ejemplo las vitaminas) proporcionan un alto valor nutritivo a estos organismos y pueden contribuir favorablemente a los nutrientes que se consumen a través de la dieta. Estos constituyentes nutricionales varían, dependiendo del tipo de especie, el momento de la cosecha, el hábitat geográfico, y las condiciones ambientales como la temperatura del agua y la intensidad de la luz, como así también la concentración de nutrientes en el agua. En varios artículos se han encontrado diferencias significativas en la concentración de los nutrientes entre géneros, y aún en el mismo género, se pueden encontrar grandes diferencias en la concentración de los constituyentes nutricionales (Peng y col., 2015).

1.4.1 Proteínas

El contenido de proteínas varía ampliamente entre géneros. Generalmente, la fracción proteica de las algas pardas es baja (3-15% del peso seco) comparado con las algas rojas y verdes (10-47%) (Lordan y col., 2011). A modo de ejemplo, la cantidad de proteínas de *Porphyra tenera* (alga roja) puede variar entre 28-47% y en el género *Ulva* (también llamada “lechuga de mar”) el contenido de proteínas puede variar entre 6-32%. Generalmente, el alto contenido de proteínas de las algas rojas son comparables con los

que se encuentran en vegetales de alto contenido proteico como la soja (cuyas proteínas representan el 35% del peso seco) (Pangestuti y Kim, 2015).

Las proteínas de las algas contienen todos los aminoácidos, y los niveles de aminoácidos esenciales son comparables con los requerimientos establecidos por la FAO/OMS (Pangestuti y Kim, 2015). Sin embargo, se sabe que hay variaciones en sus concentraciones dependiendo del género que se trate (Lordan y col., 2011), ya que el índice de aminoácidos esenciales por lo general son más altos en las algas rojas que en las algas pardas y verdes (Pangestuti y Kim, 2015).

Entre las proteínas de algas marinas, vale la pena señalar la existencia de dos grupos de proteínas funcionalmente activas llamadas lectinas y ficobiliproteínas (Pangestuti y Kim, 2011). Las lectinas son glicoproteínas, que se unen con carbohidratos y participan en muchos procesos biológicos, como la comunicación intercelular. Pueden tener actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria y anticancerígena (Chojnacka y col., 2012). Por otro lado, las ficobiliproteínas son complejos proteína-pigmento presentes en las algas, y se ha demostrado que imparten propiedades antioxidantes que podrían ser beneficiosas en la prevención o tratamiento de varias enfermedades asociadas con estrés oxidativo e inflamación (Lordan y col., 2011). Además, en algunos países las ficobiliproteínas son utilizadas como colorantes de alimentos naturales en productos como chicles, lácteos, gelatinas y sorbetes (Rasmussen y Morrissey, 2007).

Con los años, también se han identificado varios péptidos biológicamente activos derivados de algas marinas. Los péptidos bioactivos usualmente contienen 3-20 residuos de aminoácidos y sus actividades se basan en su composición y secuencia de aminoácidos (Kim y Wijesekara, 2010). Se informó que estos péptidos están implicados en diversas funciones biológicas, como actividades antihipertensivas, inmunomoduladoras, antitrombóticas, antioxidantes, anticancerígenas y antimicrobianas, además de la utilización como nutrientes (Kim y Wijesekara, 2010). En particular, se ha demostrado que existen péptidos bioactivos derivados de las algas pardas *Undaria pinnatifida* (wakame) y las algas rojas *Porphyra yezoensis* (Suetsuna, y col., 2004; Harnedy y Fitzgerald, 2011).

1.4.2 Lípidos y ácidos grasos

El contenido de lípidos de las macroalgas representan sólo el 1-5% por lo que su contribución como fuente de energía alimentaria pareciera ser baja (Lordan y col., 2011). Sin embargo, las algas pueden aportar tanto ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), los cuales contienen solo un doble enlace en toda la cadena, y ácidos grasos poliinsaturados

(PUFAs), los cuales tienen más de un doble enlace. Los aceites vegetales contienen principalmente ácidos grasos saturados e insaturados de 16- y 18-carbonos (C16-C18), mientras que los lípidos de origen marino, especialmente de las algas, están compuestas por ácidos grasos de C14-C22 (Hamid y col., 2015).

Los PUFAs presentes en las algas marinas pueden representar casi la mitad de la fracción lipídica, constituido por ácidos grasos n-3 y n-6. Además, las algas marinas pueden ser una fuente importante de ácidos grasos esenciales como el ácido linoleico (C18:2 n-6), ácido γ -linolénico (C18:3 n-6), ácido α -linolénico (C18:3 n-3), los cuales no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano (Hamid y col., 2015). Las algas rojas y pardas, por ejemplo, son particularmente ricas en los ácidos grasos n-3, ácido eicosapentanoico y ácido α -linolénico, y los ácidos grasos n-6, ácido araquidónico y ácido linoleico, junto con niveles relativamente altos de ácido oleico y palmítico (Dawczynski y col., 2007). Por el contrario, las algas verdes, como *Ulva pertusa*, se caracterizan por la presencia de ácidos hexadecatetraenoico (n-3), oleico y palmítico (Dembitsky y col., 1991).

Muchas enfermedades están relacionadas con la ingesta dietética. Idealmente, la proporción de ácidos grasos esenciales n-6/n-3 que consumimos debería ser de alrededor de 1, pero no siempre se cumple (Hamid y col., 2015). En las dietas occidentales se consumen más n-6 que n-3, alcanzándose relaciones de 15:1 y 17:1. En contraste, las dietas mediterráneas que se consideran saludables tienen una relación equilibrada de n-6 a n-3. Un exceso de n-6 puede conducir a enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Simopoulos, 2008).

Los ácidos grasos esenciales proveen de eicosanoides, los cuales producen una actividad tipo hormonal y regulan diversas funciones del cuerpo (Meschino, 2007; Zhou y Nilsson, 2001). Además, los PUFAs regulan una amplia gama de funciones en el cuerpo, incluyendo la presión arterial, la coagulación de la sangre y el correcto desarrollo y funcionamiento del cerebro y el sistema nervioso (Wall y col., 2010).

1.4.3 Minerales

Las algas generalmente presentan una amplia variedad y altos niveles de minerales (8 – 40%) (Bocanegra y col., 2009), alcanzando concentraciones más altas que las plantas terrestres comestibles y productos de origen animal. Las algas contienen cantidades significativas de minerales esenciales (Na, K, Ca, y Mg) y elementos traza (Fe, Zn, Mn y Cu), los cuales juegan un papel importante en los tejidos y en la regulación de reacciones

vitales como cofactores de muchas metaloenzimas (Peng y col., 2015). Además, las algas marinas son una de las fuentes vegetales más importantes de calcio. Por lo tanto, el consumo de algas también puede ser útil para aquellos en riesgo de deficiencia de calcio, es decir, para madres gestantes, adolescentes y ancianos.

Sin embargo, aunque algunos minerales son necesarios para la salud, otros son dañinos (por ejemplo, metales pesados como As, Cd, Cu, Hg y Pb), por lo que su presencia en altas concentraciones en algas puede limitar su uso en alimentos (Rúperz, 2002). Muse y col. (1995) demostraron que la acumulación de Pb y Cd fue evidente en *Gigartina skottsbergii* (alga roja) y otras algas pardas como *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia fuscescens* y otras del género *Adenocystis*, *Leathesia*, *Colpomenia*, las cuales fueron recolectadas de dos localidades de la Provincia de Chubut, Argentina, a pesar de que los niveles de estos metales pesados en el agua estaban dentro del rango de ambientes no contaminados.

1.4.4 Polisacáridos

Entre todos los compuestos químicos aislados de algas, los polisacáridos son los mejores establecidos y han sido objeto de una gran cantidad de estudios debido a sus extensas propiedades, tanto tecnológicas como bioactivas (Ahmadi y col., 2015).

A pesar de que el contenido de carbohidratos puede ser relativamente alto, las macroalgas por lo general no son consideradas como alimentos calóricos ya que la digestibilidad de estos carbohidratos es baja (Bocanegra y col., 2009). Esto se debe a que si bien las algas pueden contener polisacáridos de reserva tales como almidón florideano (algas rojas), almidón (algas verdes) y laminarianos (algas pardas), como así también hidratos de carbono de bajo peso molecular (por ejemplo: manitol y sacarosa), las algas se destacan por poseer, principalmente, un alto contenido de polisacáridos no digeribles que forman parte de la fibra dietaria (Rioux y Turgeon, 2015).

La fibra dietaria es una mezcla compleja de entidades químicas, y su concentración y composición en diferentes fuentes no son constantes ni uniformes (Potty, 1996). Esta diversidad física y química explica el número y la complejidad de los roles fisiológicos atribuidos a la fibra dietaria. Con respecto a los polisacáridos, cada tipo de fibra dietaria se caracteriza por sus residuos de azúcar y la naturaleza de los enlaces entre ellos.

La fibra dietaria de las algas pardas está esencialmente compuesta por 4 familias de polisacáridos: laminarianos, alginatos, fucanos y celulosa (Jiménez-Escrig y Sanchez-Muniz, 2000).

Los laminarianos, son parte de la familia de los β -glucanos. Son polímeros formados por unidades de glucosa ((1,3)- β -D-glucosa) y la estructura y composición varía, dependiendo de la especie. La cadena de glucosa puede estar ramificada con unidades (1,6)- β -D-glicósido (Peat y col., 1958) y (1,2)- β -D-glicósido (Rioux y col., 2010). Se revelaron residuos de D-manitol (cadena M) al final de ciertas cadenas de laminarianos, mientras que los otros extremos se componen de D-glucosa (cadena G) (Figura 1.1).

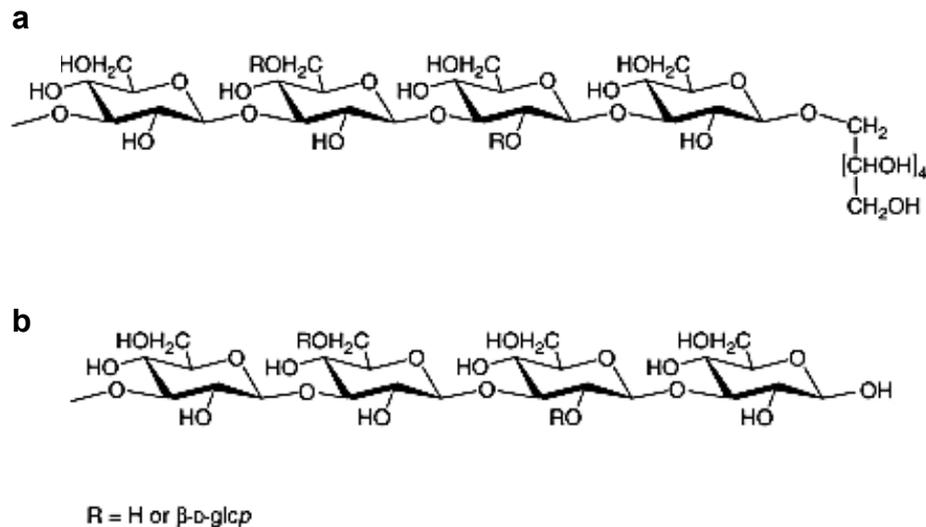


Figura 1.1: Estructura de laminarianos con (a) residuos de D-manitol (cadena M) o (b) residuos de D-glucosa (cadena G) al final de las cadenas.

El alginato es un polisacárido, derivado del ácido alginico, lineal, compuesto por ácido β -(1,4)-D-manurónico y el ácido α -(1,4)-L-gulurónico unidos por enlaces β (1 \rightarrow 4) de forma alternada (Jiménez-Escrig y Sanchez-Muniz, 2000; Rioux y Turgeon, 2015). La proporción de ácido manurónico y gulurónico es generalmente 1:1, pero estas proporciones pueden cambiar, dependiendo de la edad y la especie de alga, así como de la estación y la zona de la cosecha (Graham y Wilcox, 2000).

Las estructuras químicas de los fucanos son muy heterogéneas, y estos polisacáridos pueden ser clasificados en 3 grupos, en los que se destaca los fucoidanos, los cuales están compuestos de (1,2)-L-fucosa-4-sulfato con ramificaciones o ésteres sulfatados en el C-3, y pequeñas cantidades de D-xilosa, D-galactosa, D-manosa y ácidos urónicos (Jiménez-Escrig y Sanchez-Muniz, 2000). Se ha demostrado que los fucoidanos poseen numerosas propiedades fisiológicas y biológicas, incluidas actividades anticoagulantes, antivirales, antitrombóticas, hipotensoras, antitumorales y antioxidantes,

además de tener un efecto sobre los sistemas inflamatorio e inmunitario (Bocanegra y col., 2009; De Jesús Raposo, y col., 2015; Lordan, y col., 2011).

Por otra parte, las algas rojas poseen en su pared otros polisacáridos distintos a los anteriores, como son los galactanos sulfatados (agar y carragenanos), xilanos y mananos.

Carragenano es un término genérico para una familia compleja de polisacáridos, que se extraen de numerosas algas rojas, que consisten en galactanos sulfatados lineales en los que la α -(1,3)-galactosa se alterna con la β -(1,4,3,6)-anhidro-D-galactosa (Jiménez-Escrig y Sanchez-Muniz, 2000), unidas por enlaces α -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 4) (Rioux y Turgeon, 2015).

Las estructuras principales de carragenano están en la forma de kappa (κ), iota (ι) y lambda (λ) (Figura 1.2). Otras estructuras, como μ y η -carragenanos, son precursores de κ - y ι -carragenanos después de la modificación con álcali durante la extracción (Imeson, 2009). La diferencias entre cada tipo reside en la cantidad y la posición de sus ésteres sulfatados sustituyentes y en el contenido de (3,6)-anhidrogalactosa (Jiménez-Escrig y Sanchez-Muniz, 2000).

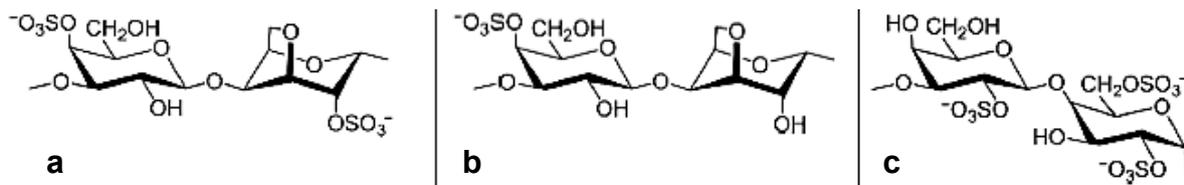


Figura 1.2: Estructura básica de (a) ι -carragenano, (b) κ -carragenano y (c) λ -carragenano.

El agar se compone de ésteres de calcio, magnesio, potasio y sulfato de sodio de unidades D- y L-galactosa, unidos por unidades alternas de (1,3)-D-galactosa y β -(1,4)-L-galactosa (Lahaye y Rochas, 1991; Murano, 1995; Stanley, 2006). El agar es un polisacárido heterogéneo y pueden existir residuos adicionales en la estructura. Pequeñas cantidades de grupos sulfato (<4,5%) se encuentran en la posición seis de la β -(1,4)-galactosa y algunas veces en las posiciones cuatro y seis de la unidad de α -(1,3)-galactosa (Imeson, 2009; Murano, 1995). Los grupos metilo, piruvato, β -D-xilopiranosas entre otros también pueden estar presentes (Rioux y Turgeon, 2015).

Las algas verdes contienen almidón, celulosa, xilanos, mananos y polisacáridos iónicos (ulvanos) que contienen grupos sulfato, L-ramnosa, D-xilosa, D-glucosa y ácido D-glucurónicos (Jiménez-Escrig y Sanchez-Muniz, 2000).

El contenido de fibra dietaria total de las algas varía entre 29,3-62,3%, porcentaje mayor que el contenido de fibra de la mayoría de las frutas y vegetales (Lordan y col., 2011), con lo cual estudios recientes sugieren que las algas comestibles se podrían utilizar para diversificar las fuentes de fibra dietaria en las dietas occidentales (Gudiel-Urbano y Goñi, 2002). Esto es importante ya que se ha demostrado que el consumo de productos enriquecidos con fibra de macroalgas promueve beneficios para la salud, incluida la prevención del cáncer de colon, diabetes tipo II, obesidad y enfermedades cardiovasculares (Cofrades y col., 2016).

1.4.5 Otros componentes minoritarios

Las vitaminas son compuestos orgánicos, que forman parte de los micronutrientes esenciales. Las vitaminas están involucradas en varias actividades biológicas como coenzimas o precursores, y en el sistema de defensa frente a la oxidación (Hamid y col., 2015).

Las macroalgas son una fuente de vitaminas y contienen tanto vitaminas hidro- como lipo-solubles. Las vitaminas más comunes en las algas son vitamina A, C, E (Hamid y col., 2015) y principalmente las que pertenecen al grupo B, donde se destaca la vitamina B12, que es particularmente recomendada en el tratamiento de los efectos del envejecimiento, el síndrome de fatiga crónica y la anemia (Cofrades y col., 2016). La vitamina B12 se encuentra en macroalgas rojas (por ejemplo, *Porphyra tenera*) y en ciertas algas verdes (Burtin, 2003; Nisizawa, 2006). Las algas rojas y pardas también pueden contener altos niveles de ácido fólico y derivados de folato, incluyendo 5-metil-tetrahidro-folato, 5-formil-tetrahidro-folato y tetrahidro-folato. Por ejemplo, concentraciones altas como 150 μg de ácido fólico/100 g alga seca se ha detectado en *Undaria pinnatifida* (Plaza y col., 2008).

Como se dijo anteriormente, las algas se clasifican en algas verdes (*Chlorophyta*), algas pardas (*Phaeophyta*) y algas rojas (*Rhodophyta*) sobre la base de la composición química y de sus **pigmentos**. El color de las algas verdes se debe a la presencia de clorofilas a y b en las mismas proporciones que las plantas "superiores", el β -caroteno (un pigmento amarillo) y varias xantofilas características (pigmentos amarillentos o parduscos). La clorofila a (Figura 1.3a) es el cofactor principal del centro de reacción, mientras que los complejos de antenas (aparatos recolectores de luz) contienen cantidades variables de clorofila a y b. La clorofila b (Figura 1.3b) está involucrada sólo en la recolección de luz,

mientras que la clorofila a está involucrada en la transducción de energía dentro de las membranas de los cloroplastos.

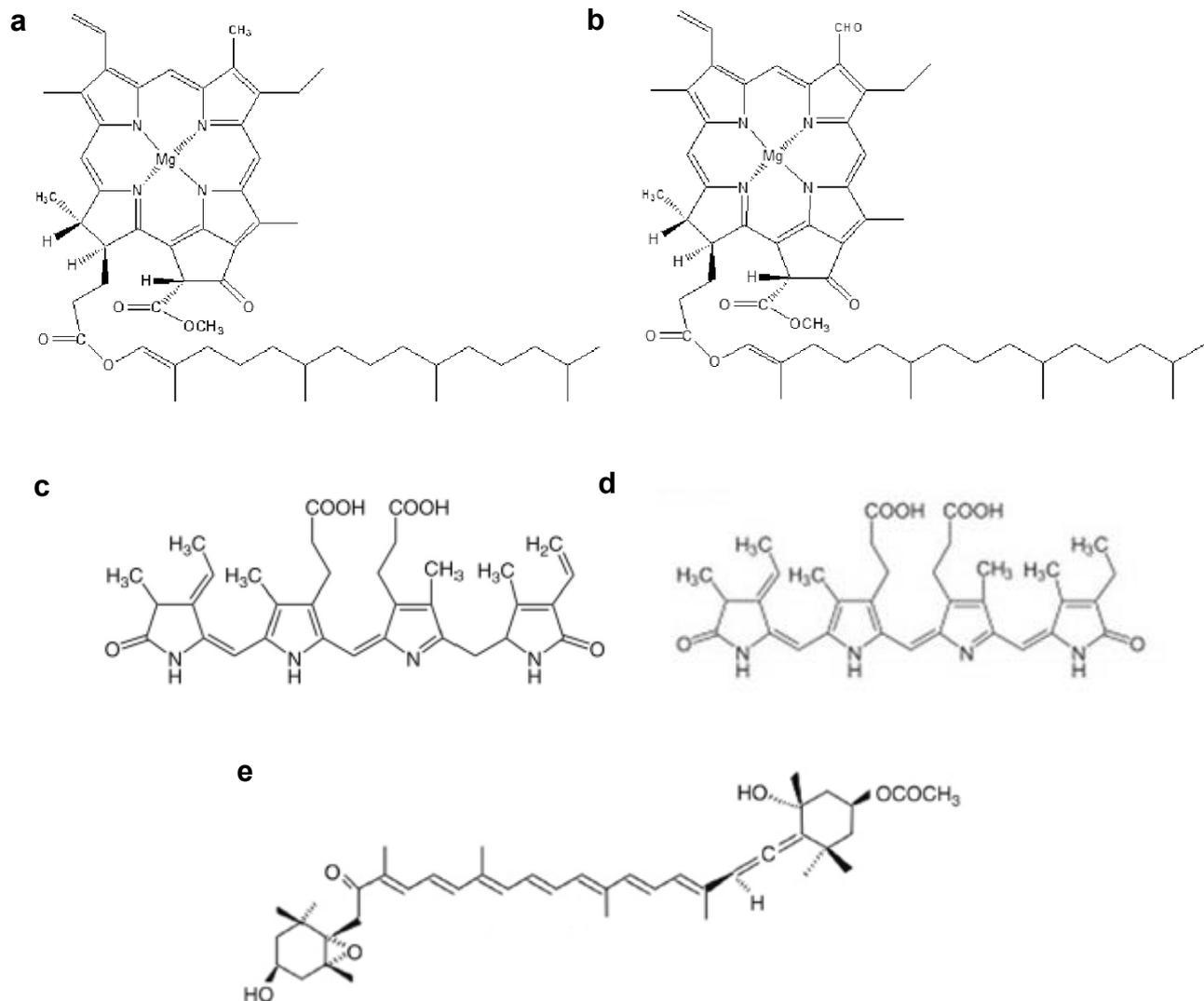


Figura 1.3: Estructura química de los principales pigmentos que se encuentran en algas marinas: **(a)** clorofila a, **(b)** clorofila b, **(c)** ficoeritrina, **(d)** ficocianina y **(e)** fucoxantina.

Dentro del grupo de ficobilinas, la ficoeritrina (Figura 1.3c) y la ficocianina (Figura 1.3d) son de importancia ya que son responsables del color de las algas rojas. La ficoeritrina absorbe la luz verde, amarilla y roja, mientras que la ficocianina absorbe la luz azul, verde y amarilla. Estas partes del espectro son el tipo de luz que penetra más profundamente en el agua de mar. Estos dos pigmentos pueden enmascarar los pigmentos como la clorofila a y el β -caroteno.

El predominio de la fucoxantina (Figura 1.3e) es responsable del color de las algas pardas. Este compuesto puede enmascarar otros pigmentos como la clorofila a y c y otras xantofilas. El contenido de fucoxantina en algas muestra una variación estacional (Haugan y Liaaen-Jensen, 1994) y también varía según el ciclo de vida de las algas marinas (Mori y col., 2004), lo que indicaría una posible importancia biológica de este pigmento en algas. La fucoxantina, cuando está presente en los talos de algas marinas, es bastante estable en presencia de ingredientes orgánicos y puede sobrevivir el proceso de secado y el almacenamiento a temperatura ambiente. Sin embargo, la fucoxantina en forma pura es susceptible a la oxidación. Por lo tanto, son necesarios métodos efectivos de estabilización para aplicar fucoxantina en nutracéuticos y formulación de alimentos funcionales (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002).

1.5 Propiedades tecnológicas

Además del rol de algunos componentes que tienen beneficios potenciales para el cuerpo humano, algunas ventajas tecnológicas pueden derivar del uso de algas marinas como ingredientes. Esto es básicamente gracias a su composición, especialmente por las propiedades fisicoquímicas de la fibra dietaria. Desde el punto de vista tecnológico, las fibras son utilizadas como agentes de textura, particularmente en alimentos de bajas calorías. Estas propiedades dependen principalmente en la capacidad de la fibra para absorber y retener agua (Rúperez y Saura-Calixto, 2001).

Los polisacáridos presentes en las algas rojas, como agar y carragenanos, y en algas pardas, como los alginatos, son los componentes más explotados comercialmente en algas marinas. Estos polisacáridos de almacenamiento exhiben propiedades texturales y estabilizantes; por lo tanto, se usan en aplicaciones alimentarias tales como soluciones acuosas, espesantes, formadores de geles, películas solubles en agua y como estabilizantes (Lordan y col., 2011).

La fibra dietaria de diferentes fuentes, han sido estudiadas por separado y en combinación con otros ingredientes de la formulaciones de diferentes productos cárnicos (productos triturados/reestructurados y emulsiones cárnicas) con el fin de aumentar los rendimientos de cocción gracias a sus propiedades de unión de agua y grasa, mejorando la textura y reduciendo los costos de formulación (Cofrades y col., 2000; Fernández-Gines, y col., 2004; Jiménez-Colmenero y col., 2005; Selgas y col., 2005; Thebaudin y col., 1997). Al mismo tiempo, altas concentraciones de minerales en las algas sugieren la posibilidad de usarlos para reducir la cantidad de NaCl en carnes procesadas. Dado que el consumo

de sodio generalmente excede las recomendaciones nutricionales en los países industrializados y aproximadamente 20-30% del consumo de sal común proviene de productos cárnicos (Wirth, 1991), existe un creciente interés entre los consumidores y elaboradores en reducir el uso de sal (minimizando el sodio).

1.6 Capacidad antioxidante

El papel de la dieta en la salud humana está ganando cada vez más atención en los últimos años (Gupta y Abu-Ghannam, 2011). En respuesta a las demandas de la sociedad de un mejor estilo de vida y una mayor longevidad, los consumidores han desarrollado un creciente interés hacia el consumo de alimentos funcionales (Fung y col., 2013), ya que éstos no solo son beneficiosos debido a la presencia de nutrientes esenciales, sino también debido a la aparición de otros compuestos bioactivos que son importantes para la promoción de la salud y la prevención de enfermedades (Gupta y Abu-Ghannam, 2011). Estos efectos beneficiosos se pueden atribuir a la compleja mezcla de fitoquímicos que poseen actividad antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena y antiviral. Los compuestos responsables de estas actividades comprenden compuestos fenólicos, polisacáridos sulfatados y ácidos orgánicos (Apostolidis y col., 2008; Liu, 2003; Podsędek, 2007), entre otros.

Los antioxidantes son metabolitos secundarios que evitan la oxidación al transformar radicales libres o radicales peroxi en no radicales mediante la donación de electrones e hidrógeno, la quelación de metales de transición y la disolución de compuestos de peroxidación (Enrique y Lester, 2002). El resultado del estrés oxidativo en las células y tejidos del cuerpo causado por especies reactivas del oxígeno (ROS) surge principalmente como resultado de la actividad metabólica del cuerpo humano durante el proceso de envejecimiento. Estos ROS también resultan en la oxidación de los lípidos, que es la razón principal del deterioro de la calidad de los alimentos que contienen lípidos durante el almacenamiento. El uso de compuestos con capacidad antioxidante es una forma efectiva de minimizar o prevenir la oxidación de lípidos en productos alimenticios, retardando la formación de productos de oxidación, manteniendo la calidad nutricional y prolongando la vida útil de los alimentos (Gupta y Abu-Ghannam, 2011).

Los antioxidantes (BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno) y TBHQ (terbutilhidroxiquinona) son ampliamente utilizados en la industria alimentaria para preservar la seguridad y la calidad de los alimentos. Sin embargo, se ha informado que

estos antioxidantes sintéticos son tóxicos y ejercen un efecto carcinogénico (Chen y col., 1992).

Entre los organismos marinos, las macroalgas representan una de las fuentes más ricas de antioxidantes naturales (Barrow y Shahidi, 2008; Chen y col., 2009; Cox y col., 2010; Taskin y col., 2007). Por lo tanto, el valor de las algas marinas como un nuevo ingrediente funcional y de salud está ganando popularidad.

Las fuertes actividades antioxidantes en las algas están presentes como mecanismos de protección química (Fung y col., 2013). Las algas marinas viven en un ambiente hostil en donde están frecuentemente expuestas a una combinación de luz fuerte, fluctuaciones de temperatura, estrés osmótico y desecación que pueden conducir a la formación de radicales libres y otros agentes oxidantes fuertes (ROS) (Gupta y Abu-Ghannam, 2011). Sin embargo, el daño a los componentes estructurales (ácidos grasos poliinsaturados) o cualquier daño fotodinámico grave de las algas rara vez ocurren. Para sobrevivir a estos duros ambientes marinos, las algas han desarrollado fuertes sistemas de defensa antioxidante que consisten en una serie de compuestos que pueden funcionar o no de forma sinérgica para limitar la oxidación. Las sustancias bioactivas que actúan como compuestos antioxidantes son principalmente polifenoles y pigmentos, como los carotenoides (Fung y col., 2013).

Las algas pardas contienen concentraciones más altas de polifenoles que las algas rojas o verdes (Cofrades y col., 2016). Los compuestos fenólicos que se encuentran en las algas también incluyen los florotaninos, que se encuentran exclusivamente en las algas pardas. La familia de los carotenoides también es importante debido a su alta actividad antioxidante y gran diversidad estructural. Existen numerosos estudios que asocian la actividad antioxidante de diferentes algas con sus contenidos de carotenoides. En este sentido, los carotenoides obtenidos de *Undaria Pinnatifida*, ha demostrado cierta actividad contra las enfermedades cerebrovasculares (Ikeda y col., 2003).

1.7 Propiedad antimicrobiana

La expresión de la actividad antimicrobiana de un extracto natural o un compuesto sintético es generalmente muy clara, pero el mecanismo para esta acción sólo se entiende de forma moderada. Los compuestos fenólicos atacan las paredes celulares y las membranas celulares de los organismos, lo que da como resultado la liberación de constituyentes intracelulares. Además, se ha informado que la interferencia con la función de la membrana, como la interrupción del transporte de electrones, la absorción de

nutrientes, la síntesis de ácidos nucleicos y la actividad enzimática, son modos de acción. Por lo tanto, los compuestos fenólicos activos podrían tener varios objetivos invasivos que podrían conducir a la inhibición de bacterias (Grupa y Abu-Ghannam, 2011).

Si bien muchos estudios *in vitro* afirman que los compuestos bioactivos, como polifenoles y florotaninos de las algas poseen acción antimicrobiana contra varias bacterias Gram positivas y negativas, no existe literatura científica que demuestre la actividad antibacteriana de los extractos de algas marinas en productos alimenticios (Moroney y col., 2013; Gupta y Abu-Ghannam, 2011).

1.8 Algas en el desarrollo de alimentos cárnicos

En los últimos años, ha aumentado el interés y la demanda de alimentos funcionales (López-López y col., 2009). Éstos últimos, son aquellos alimentos que se consumen como parte normal de una dieta y que contienen componentes biológicamente activos, los cuales ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo a sufrir determinadas enfermedades (Gago Cabezas y col., 2009). Por este motivo, las investigaciones se centran de forma creciente en la identificación de compuestos biológicamente activos y en su interacción con otros componentes de alimentos.

Para elaborar nuevos alimentos funcionales, normalmente se modifica la composición original de un alimento determinado y se introduce alguna variación para incrementar los componentes biológicamente activos que aporten beneficios al organismo o para reducir los que causan efectos negativos. Asimismo, un alimento funcional se puede obtener incorporando ciertos elementos bioactivos que no contiene el alimento de forma natural (o los tiene en baja proporción) y se comprueba científicamente el beneficio para la salud.

Se destacan entre ellos los alimentos funcionales a base de carne, que brindan una oportunidad excelente para que la industria cárnica aborde las demandas de los consumidores, promoviendo la ingesta de ingredientes funcionales sin ningún cambio radical en los hábitos alimentarios (López-López y col., 2009). El desarrollo de alimentos funcionales a base de carne implica en gran medida la modificación de la composición de la carne procesada para optimizar la presencia de ciertos componentes mediante estrategias de reformulación. De esta forma, se han reformulado numerosos productos cárnicos utilizando diversos ingredientes no cárnicos para promover la presencia de una amplia variedad de compuestos bioactivos (Anandh y col, 2003; Arihara, 2006; Fernández-Ginés y col., 2005; Jiménez-Colmenero y col., 2001; Jiménez-Colmenero y col., 2006). Es importante resaltar que la modificación del producto cárnico no daría lugar necesariamente

a un alimento funcional ya que la legislación exige la demostración del efecto funcional y esto es un aspecto primordial que se debe tener en cuenta, ya que puede ser una tarea larga y costosa.

El uso de las algas marinas como ingrediente funcional, al contener diversos compuestos bioactivos con potenciales beneficios para la salud, abre posibilidades en el procesamiento de alimentos, incluidos los productos cárnicos (López-López y col., 2009). Asimismo, las algas marinas suministran diversos ingredientes con aplicaciones tecnológicas (por ejemplo, fibras utilizadas como agentes de textura) que se han utilizado en el procesamiento de carne. Además, otros componentes de algas marinas como los aceites de algas se han utilizado para producir productos cárnicos enriquecidos con PUFAs, como hamburguesas de pavo, salchichas de cerdo frescas y jamones reestructurados (Lee y col, 2006).

1.9 La hamburguesa

La hamburguesa es un producto alimenticio consumido ampliamente en todo el mundo. En los últimos años, la demanda de comida rápida ha aumentado rápidamente y la mayoría de los productos incluidos en la comida rápida contienen altas concentraciones de grasa, azúcar, sal, colesterol y ácidos grasos saturados, y son deficientes en carbohidratos complejos (López-López y col., 2010).

El Código Alimentario Argentino (Capítulo VI, Artículo 302) define a los chacinados como “los productos preparados sobre la base de carne y/o sangre, vísceras u otros subproductos animales que hayan sido autorizados para el consumo humano, adicionados o no con sustancias aprobadas a tal fin.” Dentro de esta denominación se encuentran las hamburguesas, especificadas bajo el Artículo 330 (Resolución Conjunta SPReI y SAV N° 1 - E/2017): “Se entiende por hamburgués o bife a la hamburguesa, al producto de forma plana, elaborado exclusivamente con carne vacuna picada con un contenido graso promedio en el lote no mayor al veinte por ciento (20%), sal, con o sin el agregado de antioxidantes, aromatizantes, saborizantes, especias, exaltadores de sabor, estabilizantes, (únicamente fosfatos y polifosfatos) estabilizantes de color (excluyendo nitritos y nitratos) autorizados. En caso de utilizarse carnes distintas de la vacuna, deberá denominarse “Hamburgués de...” o “Bife a la Hamburguesa de...” seguido de la denominación de la o de las especies que lo componen.”

Como la hamburguesa es uno de los alimentos principales que forma parte de las comidas rápidas, y la investigación epidemiológica ha demostrado una relación entre el

consumo de comidas rápidas y el aumento de una serie de enfermedades crónicas, que incluyen cáncer de colon, obesidad, enfermedades cardiovasculares y varios otros trastornos (Beecher, 1999; Best, 1991; Kaferstein y Clugston, 1995), se está impulsando a la industria de la carne a cambiar para mejorar la calidad de productos como hamburguesas. Estos son productos cárnicos comunes, ampliamente aceptados en ciertos grupos de población, y entre las ventajas que presentan es la posibilidad de inducir cambios de composición para mejorar su valor nutricional y sus propiedades benéficas para la salud (López-López y col., 2010).

1.10 Reformulación de productos cárnicos

En la actualidad uno de los objetivos de la industria cárnica es obtener productos con menor contenido graso, mejor perfil de ácidos grasos y con la incorporación de ingredientes saludables, tratando de evitar o reducir la incorporación de compuestos considerados riesgosos para la salud. Los productos cárnicos pueden ser modificados por adición de ingredientes considerados beneficiosos para la salud o bien por eliminación o reducción de ciertos componentes que son considerados perjudiciales (Fernández-Ginés y col., 2005; Ayo y col., 2007; Cofrades y col., 2008).

Para poder elaborar un producto cárnico tipo hamburguesa, se debe comenzar con el picado de la carne. En esta primera etapa, se produce la rotura del músculo, en donde se intenta desintegrar su microestructura, a fin de liberar las proteínas miofibrilares. La solubilización de estas proteínas antes de la cocción es esencial para la emulsificación, la gelación y la retención de agua (Xiong, 1994). El agregado de sal (NaCl) y polifosfatos favorecen la solubilización de las proteínas miofibrilares que es de suma importancia ya que son las que emulsionarán a los pequeños gránulos de grasa que se obtienen durante el picado, situándose como una fina película en la superficie de separación entre las dos fases, impidiendo así su coalescencia. Este tipo de productos se los consideran emulsiones, ya que por microscopía se ha observado a los glóbulos grasos rodeados por una capa de proteína absorbida (Foegeding y col., 1996). Esta capa proteica se produciría durante el picado. Sin embargo, después de calentar la grasa quedaría en parte atrapada en la red continua de proteína gelificada.

Tradicionalmente, este tipo de alimentos cárnicos procesados contiene un nivel elevado de grasa animal (la cual está mayoritariamente compuesta por ácidos grasos saturados) y de sodio, debido a la gran cantidad de sales de sodio incorporadas para lograr las propiedades deseadas en estos productos. Sin embargo, la búsqueda de alimentos más

sanos que respondan a las necesidades de la población en cuanto a requerimientos nutricionales y precio, hacen necesario el desarrollo de productos con otros ingredientes tales como hidrocoloides, gomas y proteínas no cárnicas en la formulación, los cuales se agregan durante el mezclado de los ingredientes, pre-emulsificado o no, logrando una reducción considerable en los niveles de sodio y grasa, gracias a las propiedades funcionales de estos ingredientes. Asimismo, los procesos de sustitución de grasa basados en la incorporación de proteínas parecen ofrecer ventajas sustanciales a los productos bajos en grasa, pero normalmente se requieren mejoras en las características texturales que no pueden ser logradas únicamente por la incorporación de proteínas (Keeton, 1994). El agregado de gomas en combinación con proteínas podría ser adecuado como sustituto de grasa. A su vez, se puede sustituir parte de la grasa animal por aceites con una menor cantidad de ácidos grasos saturados, mayor contenido PUFAs y sin colesterol. Este reemplazo implica una matriz cárnica que sea capaz de retener esta fase grasa líquida más eficientemente, para lo cual la emulsificación o pre-emulsificación ha sido una alternativa altamente empleada.

Finalmente, se moldean las hamburguesas con el tamaño y peso deseado, se envasan y se refrigeran hasta su posterior cocción e ingesta.

Como se ha dicho anteriormente, la **sal** es uno de los ingredientes que contribuye a la solubilización de las proteínas. Además, es un ingrediente necesario para la aceptabilidad de estos productos por su efecto en sabor, textura, suavidad y jugosidad. La mayoría de las formulaciones de productos cárnicos contienen sal en un porcentaje de 0,3 a 2,0. Sin embargo, su consumo en altas cantidades contribuyen a la hipertensión arterial y aumentan el riesgo de cardiopatía y accidente cerebrovascular (OMS, 2016). En nuestro país, la iniciativa “Menos Sal Más Vida” (Ministerio de Salud de la Nación) del año 2011, tiene como objetivo disminuir progresivamente el consumo de sal de la población, para reducir así la importante carga sanitaria que representan las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y renales. Constituye una de las principales acciones de promoción de la salud y forma parte de un plan integral de prevención y control de enfermedades crónicas no transmisibles. Esto ya ha entrado en vigencia, y hoy se refleja en el Código Alimentario Argentino, estableciendo un contenido máximo de sodio para las hamburguesas de 850 mg de sodio/100 g de producto, lo que representa una reducción mínima de un 15% del contenido máximo de sodio en el producto. Además, la adición de fosfatos, como el **tripolifosfato de sodio** ($\text{Na}_3\text{H}_2\text{P}_3\text{O}_{10}$), permite usar niveles más bajos de

sodio en productos emulsificados, ya que mejoran la solubilidad de las proteínas miofibrilares (aumentando el ligado y reduciendo la pérdida de humedad y rendimiento en los productos) por aumentar la capacidad de retención de agua de las miofibrillas. Aunque generalmente los fosfatos son sales sódicas, su aporte de Na^+ a la ingesta representa una cantidad baja debido a la poca cantidad que se agrega de este aditivo (0,5 g/100g respecto al 2 - 4 g/100g de NaCl).

Las **proteínas de leche** presentan calidades nutritivas de muy alto valor biológico. Estas proteínas se pueden clasificar como caseínas, proteínas del suero y las que forman parte de la membrana del glóbulo graso (solamente el 1% del total).

Las caseínas (αS_1 , αS_2 , β y κ caseína) suponen el 80% de las proteínas totales. Las estructuras primarias revelan una distribución particular de residuos polares e hidrófobos, y la agregación de estos residuos en diferentes dominios polares e hidrófobos originan una estructura anfipática. Las moléculas individuales de caseína se caracterizan en general por tener un tamaño mediano, contar con pocos tramos con estructura secundaria organizada, debido a la presencia de abundantes restos de prolina, y tener unidos covalentemente grupos fosfato a algunos de los restos de serina, y muy ocasionalmente a restos de treonina. Como resultado de su fosforilación y estructura anfifílica, las caseínas interactúan entre sí y con el fosfato cálcico para formar grandes micelas esféricas, las cuales contienen un 92% de proteína y un 8% de sales. Las micelas tienen como característica la hidratación excepcional: pueden ligar 3,7 g de agua cada gramo de caseína. Las caseínas tienen excelente solubilidad y estabilidad térmica por encima de pH 6. Estas proteínas también tienen muy buenas propiedades emulsionantes por sus estructuras anfifílicas.

Las proteínas del suero representan un 17% del total de las proteínas de la leche. Las estructuras de las proteínas de suero, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, que constituyen el 80% de las proteínas del suero, son típicas de estas y otras proteínas globulares. Al igual que las caseínas, tienen una carga negativa neta al pH de la leche; sin embargo, a diferencia de las caseínas, la secuencia de distribución de los residuos hidrófobos, polares y cargados es bastante uniforme. Consecuentemente, estas proteínas se pliegan intramolecularmente, para alojar interiormente la mayoría de sus residuos hidrófobos.

Los beneficios de las proteínas de la leche como ingredientes de otros alimentos surgen de sus excelentes propiedades nutricionales y capacidad para contribuir esencialmente a las propiedades funcionales de los alimentos. Las propiedades funcionales de las proteínas están relacionadas con diversas características moleculares generales tales como la

hidratación, actividad de superficie y el tipo de interacciones proteína-proteína favorecidas por estructuras parcialmente no desplegadas. La hidratación es un parámetro particularmente importante porque la solubilidad es un requisito de muchas propiedades funcionales excelentes y la captación de agua es una función esencial en muchos alimentos. El orden de actividad de superficie de diversos componentes proteicos de la leche es β caseína > micelas de caseína monodispersadas > albúmina sérica > α lactoalbúmina > α S caseína – κ caseína > β lactoglobulina (Mulvihill, 1992). En cuanto a la interacción con otras proteínas, las caseínas son singulares porque sus estructuras flexibles les permiten la interacción con muchas estructuras parcialmente desplegadas de otras proteínas por interacción hidrófoba y/o por extensión de la estructura secundaria. Por ello, las proteínas de leche son utilizadas en productos cárnicos para mejorar la capacidad de retención de agua, funcionar como emulsificantes, mejorar de las características de textura y jugosidad (Ellekjaer y col., 1996; Hermansson y Åkesson, 1975; Barbut, 2006; Andrés y col., 2006).

Para cumplir con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, no sólo se debe disminuir el contenido de lípidos de los productos cárnicos procesados sino también **modificar su perfil lipídico**. El reemplazo de ácidos grasos saturados por insaturados (cis) produce una favorable disminución del colesterol LDL y de la relación colesterol total/colesterol HDL. El consumo de ácidos grasos saturados y trans aumenta la colesterolemia, mientras que los ácidos grasos insaturados producen un efecto contrario.

Existen diferentes métodos para modificar la cantidad y calidad de los ácidos grasos de alimentos cárnicos procesados. Una de las estrategias es la utilización de aceites de diferentes orígenes. Se han utilizado tanto aceites de pescado como aceites vegetales (parcialmente hidrogenados de maíz, semilla de algodón, palma, soja, maní, girasol de alto contenido en ácido oleico, semilla de algodón y oliva) en productos tales como hamburguesas y salchichas (Liu y col., 1991; Márquez, y col., 1989; Park, y col., 1989). Asimismo, los aceites vegetales son también una fuente importante de tocoferoles y fitoesteroles, con efectos antioxidantes y efectos hipocolesterolémicos, respectivamente.

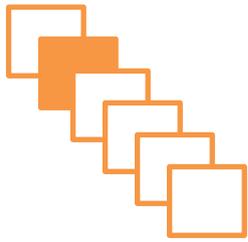
Dependiendo del tipo de aceite, los productos pueden presentar algunas diferencias, además de las sensoriales, respecto de sus productos de referencia, pero estas diferencias pueden reajustarse mediante una o más estrategias para la producción de productos bajos en grasa (Jiménez-Colmenero, 1996). Por ejemplo la inclusión de aceite también altera la textura de las emulsiones cárnicas con una tendencia general hacia productos más

blandos (Álvarez y col., 2012), pero algunos investigadores han empleado gomas o proteínas no cárnicas o combinaciones de ambas, dando como resultado productos con buenas propiedades funcionales y sensoriales (Andrés y col., 2009; Jiménez-Colmenero, 2013).

Liu, Huffman y Egbert (1991) reportaron de manera general que era posible la sustitución del 10 % de la grasa animal por aceites vegetales parcialmente hidrogenados (maíz, algodón, maní y soja) ya que los efectos observados sobre la composición y aceptabilidad en pastas cárnicas resultaban favorables.

En conclusión, el desarrollo de alimentos funcionales abre nuevas posibilidades para el uso de algas. Una de ellas es la oportunidad para que la industria cárnica mejore su “imagen” y aborde las demandas de los consumidores. Desde el punto de vista nutricional, las algas pueden ayudar en la búsqueda de productos cárnicos que contengan menos sodio y actuar como buenas fuentes de algunos minerales, ayudando a alcanzar la ingesta diaria recomendada de algunos minerales esenciales y oligoelementos. De hecho, existen estudios que están analizando la utilización de las algas marinas como alternativa a la sal (FAO, 2016). Además, la adición de algas a productos cárnicos procesados podría mejorar el perfil de ácidos grasos, ajustando al producto a objetivos de consumo más saludable.

Desde el punto de vista tecnológico, la adición de algas a productos cárnicos permite modificar la capacidad de retención de agua y aportar fibras y antioxidantes al producto. La fibra dietaria (tanto soluble como insoluble) de las algas pueden incrementar el rendimiento en cocción, mejorar la textura, la retención de agua, la estabilidad de la emulsión y disminuir los costos de la formulación de productos cárnicos (Moroney y col., 2013). Por otra parte, la adición de algas marinas podría aumentar el contenido de moléculas con actividad antioxidante, las cuales pueden mejorar la estabilidad oxidativa durante el procesamiento y almacenamiento del producto.



2. *Objetivos*

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

- Realizar una caracterización química y nutricional de harinas de algas marinas de importancia en las costas argentinas producidas por una industria nacional.
- Evaluar la inclusión de la/s harina/s de macroalgas en un alimento cárnico empleando carne porcina magra, aceite vegetal como fuente de ácidos grasos insaturados, y contenido de sodio reducido para lograr productos cárnicos saludables.

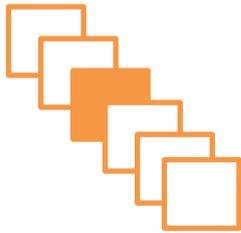
2.2 Objetivos particulares

I. **Sobre las harinas de algas marinas de diferentes géneros:**

- Determinar actividad acuosa y tamaño de partícula.
- Determinar la composición centesimal (humedad, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, fibra y cenizas) y obtener el perfil lipídico para evaluar su potencial uso como fuente de ácidos grasos saludables.
- Caracterizar mediante determinación de capacidad de retención de agua y aceite, y grado de hinchamiento.
- Evaluar su contenido de pigmentos, polifenoles totales y su capacidad antioxidante.

II. **Sobre hamburguesas de carne porcina formulada con harina/s de algas:**

- Evaluar el reemplazo de concentrado de proteínas de leche por harina de algas como ligante/emulsificante en sistemas cárnicos procesados con aceite de girasol alto oleico pre-emulsificado y reducido contenido de sodio.
- Caracterizar los productos mediante parámetros como rendimiento, encogimiento, color, jugosidad, textura y estabilidad frente a la oxidación lipídica durante su almacenamiento congelado durante 6 meses.
- Analizar si la incorporación de harina de algas mejora las características de calidad de las hamburguesas así como su capacidad antioxidante y perfil de ácidos grasos.



3. *Materiales y Métodos*

3. MATERIALES Y MÉTODOS

PARTE I: Estudio y caracterización de harinas de algas marinas comestibles

3.1 Materia prima

Las harinas de algas que fueron estudiadas en este trabajo fueron provistas por la empresa Soriano, Trelew, Argentina. Consistieron en harinas de algas de 3 géneros diferentes, obtenidas de la costa patagónica:

- *Undaria* sp. → algas pardas
- *Porphyra* sp. → algas rojas
- *Ulva* sp. → algas verdes

Las muestras recibidas fueron fraccionadas y envasadas en bolsas Cryovac BB4L (Sealed Air Co., Buenos Aires, Argentina; PO_2 : $35 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ día}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ a 23 °C) bajo vacío y congeladas a -20 °C hasta su uso.

3.2 Determinaciones realizadas

Las determinaciones realizadas sobre las tres harinas de algas se describen a continuación.

3.2.1 Actividad acuosa

Para la determinación de la actividad acuosa (a_w) se utilizó un equipo AquaLabDew Point Series 4 4TEV (Decagon Devices INC. MA, EE.UU.) (Figura 3.1). Las medidas fueron realizadas a 25 °C por duplicado.

Este equipo mide la a_w de las muestras siguiendo la metodología de los sensores de punto de rocío. En este tipo de instrumentos la muestra se equilibra dentro de una cámara sellada que contiene un espejo que permite detectar la condensación en él. En el punto de equilibrio, la humedad relativa del aire en la cámara es igual a la a_w de la muestra. Una célula fotoeléctrica y un termistor detectan el punto exacto en el que se produce la condensación y la temperatura, respectivamente. Un haz infrarrojo centrado en un pequeño espejo determina la temperatura de punto de rocío precisa de la muestra. Esa temperatura de punto de rocío se traduce entonces en la actividad de agua.



Figura 3.1: Equipo AquaLab Dew Point Series 4 4TEV

3.2.2 Tamaño de partícula

Se determinó la distribución de tamaños de partículas en las harinas de algas mediante un equipo de dispersión estática de luz Malvern Mastersizer 2S, Malvern (Instruments Ltd., Reino Unido) (Figura 3.2), perteneciente a la Universidad de Quilmes (UNQUI, Bernal, Argentina). El rango de medición del equipo se encuentra entre los $0,1 \mu\text{m}$ a $1000 \mu\text{m}$. La técnica de difracción láser opera bajo la predicción del comportamiento de las partículas sobre la dispersión de luz. Las partículas dispersan luz en todas las direcciones con un patrón de intensidad que es dependiente de su tamaño. La luz dispersada tendrá diferentes intensidades según el ángulo de observación. El equipo empleado utiliza la teoría de Mie para determinar el tamaño de las partículas. Esta teoría describe la radiación en y alrededor de una partícula esférica en un medio homogéneo y no-absorbente en todas las direcciones espaciales. Las partículas pueden ser transparentes o completamente absorbentes. La Teoría de Mie postula que la difracción de luz es un fenómeno de resonancia. Si un rayo de luz con una longitud de onda determinada incide sobre una partícula, ésta creará oscilaciones electromagnéticas en la misma frecuencia que la luz incidente, dependientes de la relación entre la longitud de onda de la luz con el diámetro de la partícula y el índice de refracción entre las partículas y el medio. La partícula es susceptible a la recepción de determinadas longitudes de onda y reemite la energía como una estación de emisión, en una distribución espacial angular definida. Según la Teoría de Mie, son posibles múltiples estados de oscilación con diferentes probabilidades y existe una relación entre la sección ópticamente efectiva y el tamaño de la partícula, la longitud de onda y el índice de refracción entre las partículas y el medio. Para aplicar la Teoría de

Mie es necesario conocer el índice de refracción y el coeficiente de absorción de la muestra y del medio. El índice de refracción adoptado fue de 1,52 y el coeficiente de absorción considerado para las partículas fue de 0,1.

Para cada determinación, aproximadamente 2 g de muestra se dispersaron en 500 mL de agua con una unidad de dispersión Hydro 2000MU Malvern (Instruments Ltd; Worcestershire, UK). La velocidad de la hélice se mantuvo en 2000 rpm. Asimismo luego de haber registrado la medida sin sonicar, se aplicó ultrasonido en un sonicador TestLAB TB04n (Bernal, Argentina) durante 30 segundos a fin de evitar la agregación de las harinas. La distribución del tamaño de partículas, antes y después de la sonicación (TestLAB TB04n, Bernal, Argentina) fueron realizadas por duplicado y expresadas como frecuencia en volumen.

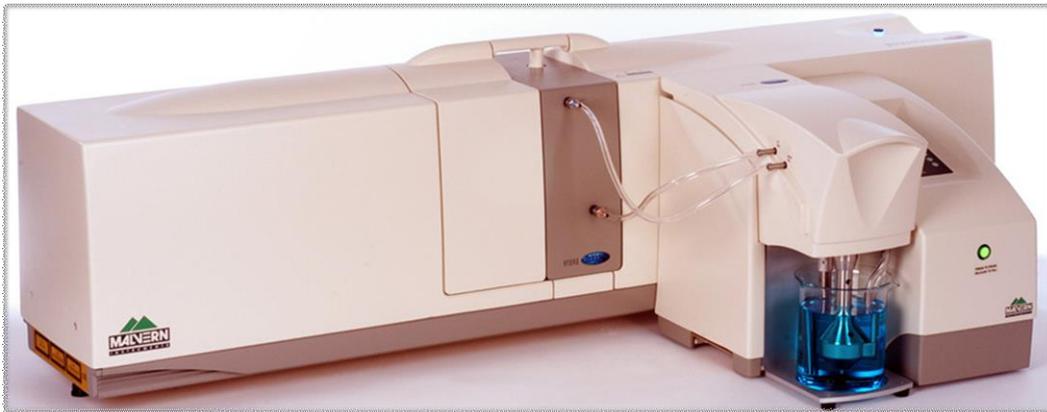


Figura 3.2: Equipo de dispersión estática de luz para medir tamaño de partícula.

3.2.3 Parámetros físico-químicos

Para la determinación de los parámetros físico-químicos de las harinas de algas se siguieron los métodos descritos por Gómez-Ordóñez y col. (2010). Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

I. Capacidad de retención de agua y de aceite

Se pesaron aproximadamente 0,5 g de cada una de las harinas en tubos de centrifuga, registrándose su peso exacto. A continuación se añadieron 30 ml de agua destilada. Se agitó suavemente para lograr una hidratación completa del polvo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 h en oscuridad. A continuación, se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 20 minutos a 20°C, se descartó el sobrenadante y se pesó el precipitado. La capacidad de retención de agua (CRA) se expresó como g de agua retenida/g harina de algas.

Para la determinación de la capacidad de retención de aceite, se procedió de igual manera que el caso anterior, pero utilizando aceite de girasol alto oleico en lugar de agua. Finalmente, la capacidad de retención de aceite (CRAc) se expresó como g de aceite retenido/g harina de algas.

II. Grado de hinchamiento

Se pesaron 0,125 g de cada harina en pequeñas probetas graduadas y se añadieron 2,5 ml de agua destilada. Se agitó suavemente y se tapó con papel Parafilm. Se dejaron reposar las muestras durante 24 h a temperatura ambiente. Finalmente, se leyó directamente el volumen ocupado por las harinas de algas hidratadas. El grado de hinchamiento (GH) se expresó como ml ocupados/g de harina de algas.

3.2.4 Composición centesimal

Se determinó el contenido de humedad, cenizas totales, proteínas y lípidos empleando métodos AOAC (1984). También se determinaron hidratos de carbono y fibra dietaria total.

I. Determinación de humedad

La humedad se determinó mediante el método indirecto (método 24.002, AOAC, 1984). Se pesaron 2 g de cada una de las muestras en cajitas de aluminio previamente pesadas y se secaron a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ en estufa de vacío (Instrumentación Científica, Buenos Aires, Argentina) hasta peso constante. Antes de pesar la masa seca (MS), las muestras fueron conservadas en desecador, hasta alcanzar temperatura ambiente. Cada determinación se realizó por duplicado.

El contenido porcentual de humedad se calculó según la fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = 100 - MS$$

Donde MS se calcula según:

$$MS = \left(\frac{M3 - M1}{M2 - M1} \right) \times 100$$

Dónde:

M1: peso en g de la caja de aluminio.

M2: peso en g de la caja de aluminio + muestra en g.

M3: peso en g de la caja de aluminio + muestra seca en g.

II. Determinación de cenizas totales

Se determinó el contenido de cenizas totales de cada muestra mediante su calcinación en mufla (Método 24.009, AOAC, 1984).

Primero, se pesó 1 g de cada muestra en cápsulas de porcelana previamente calcinadas y pesadas, y se procedió a la carbonización de la materia orgánica sobre triángulo de pipas y mechero, hasta residuo carbonoso. Luego, los residuos se calcinaron en mufla a 550°C hasta cenizas blancas o color gris claro. Se dejaron enfriar en desecador hasta temperatura ambiente para luego pesar.

El contenido porcentual de cenizas totales se calculó según la fórmula:

$$\text{cenizas totales (\%)} = \left(\frac{M2 - M1}{M3} \right) \times 100$$

Dónde:

M1: peso en g de la capsula vacía.

M2: peso en g de la capsula + muestra calcinada.

M3: peso en g de la muestra.

III. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas de cada muestra se determinó mediante el método de Kjeldahl-Arnold-Gunning (Método 24.027, AOAC, 1984) en equipo digestor y destilador Büchi 320 (Suiza).

Se pesaron 0,5 g de muestra y se colocaron en tubo digestor con 2 g de mezcla catalizadora (10 g de K_2SO_4 o Na_2SO_4 + 1 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) y 15 ml de H_2SO_4 concentrado. Se conectaron los tubos en una trampa de vapores y luego se procedió al calentamiento de los mismos hasta completar la digestión de la materia orgánica: se observó en todos los tubos un color azul verdoso translúcido. Se dejaron enfriar y posteriormente cada tubo de digestión se conectó al equipo destilador, colocando un Erlenmeyer con 50 ml de H_3BO_3 4% con unas gotas de indicador Mortimer (rojo de metilo - verde de bromocresol) en la salida para recoger el NH_3 destilado. El agregado de agua y NaOH 32% al tubo digestor se realizó automáticamente, mediante interruptores, hasta que la solución tomó color marrón, indicando la neutralización del ácido y exceso de base. Se destiló hasta alcanzar un volumen de 150 ml aproximadamente en el Erlenmeyer colector.

Por último, el destilado se tituló por retorno con H_2SO_4 0,0924 N con agitación constante hasta el viraje del indicador (V_{muestra}).

Paralelamente se realizó un blanco en las mismas condiciones descritas sin muestra agregada (V_{blanco}). Todas las muestras se realizaron por duplicado.

Se utilizó el factor de conversión (f) propuesto para algas (Angell y col., 2015) de 5,00 g proteínas/g N para calcular el contenido porcentual de proteínas de la muestra, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ proteína} = \left(\frac{(V_{\text{muestra}} - V_{\text{blanco}}) \times N \times 0,014 \times f}{g \text{ muestra}} \right) \times 100$$

IV. Determinación del contenido de lípidos y perfil de ácidos grasos

El **contenido de lípidos** de cada muestra se determinó mediante el método de Soxhlet (Método 24005, AOAC, 1984) que consiste en una extracción semi-continua de los lípidos con éter de petróleo.

Preparación de la muestra y extracción de lípidos: En un cartucho de papel de filtro se pesaron 2,5 g de muestra. Éste, correctamente cerrado, se colocó en el tubo extractor. Luego, se conectó el balón, previamente pesado, al tubo extractor. Por la parte superior de este último, se agregó éter de petróleo (Peb: 35-60°C) y se conectó a una línea refrigerante. La extracción se realizó a reflujo durante 7 ciclos de extracción, sobre una manta calefactora. Una vez finalizada la extracción, se eliminó el solvente del balón por evaporación hasta peso constante, obteniéndose así la fracción lipídica de cada una de las muestras. Todas las muestras se ensayaron por duplicado.

El contenido de lípidos se calculó según la fórmula:

$$\% \text{ Lípidos} = \left(\frac{(\text{Peso balón con lípidos} - \text{Peso balón vacío})}{g \text{ muestra}} \right) \times 100$$

La técnica para determinar el **Perfil de ácidos grasos** consiste en una extracción y derivatización de los ácidos grasos presentes en la muestra y su posterior cuantificación mediante cromatografía gaseosa.

Primero, se pesaron 0,2 g de la muestra a ensayar y se mezclaron con 20 ml de una mezcla metanol/cloroformo 1:2 y se dejó en contacto por 24 h en heladera. Una vez transcurrido ese tiempo, se filtró con papel de filtro en un tubo Falcon. Al filtrado se

agregaron 3,5 ml de agua destilada y una vez que se separaron las dos fases, se descartó la fase superior. El líquido resultante (mezcla de cloroformo con ácidos grasos) se llevó a sequedad en rotavapor (Büchi Rotavapor R-124, Essen, Alemania) a 45°C. El residuo del balón se resuspendió con 4 ml de hexano, los cuales se transfirieron a otro tubo Falcon y se mezcló en vórtex por 30 segundos. Posteriormente, se agregaron 0,3 ml de una solución metanólica de KOH 2N con el fin de saponificar a los ácidos grasos, se agitó en vórtex y se agregó una pizca de Na₂SO₄, el cual actuó como desecante. Por último, se dejaron decantar los sólidos y se tomó 1 ml de la fase superior, obteniendo así la muestra debidamente acondicionada.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizaron en un equipo Agilent Technologies 7890 A provisto de una columna capilar DB-23. El tiempo total de corrida fue de 34,75 minutos. Se utilizó un estándar externo de 37 ácidos grasos C4-C24 (Supelco 37 component FAME MIX, 100 mg Neat).

Los resultados se expresaron como % de ácidos grasos.

Con los resultados obtenidos se calcularon dos índices según las siguientes fórmulas:

$$\text{Índice de Aterogenicidad (IA)} = \frac{[C12:0 + (4 \times C14:0) + (C16:0)]}{[(n-6 \text{ PUFA} + n-3 \text{ PUFA}) + \text{MUFA}]}$$

$$\text{Índice de Trombogenicidad (IT)} = \frac{[C14:0 + C16:0 + C18:0]}{[(0.5 \times \text{MUFA}) + (0.5 \times n-6 \text{ PUFA}) + (3 \times n-3 \text{ PUFA}) + (n-3 \text{ PUFA} / n-6 \text{ PUFA})]}$$

V. Determinación de hidratos de carbono totales

La determinación de los hidratos de carbono totales presentes en las muestras se realizó por el método de Antrona/Sulfúrico.

Preparación de la muestra: Se realizó mediante una hidrólisis ácida parcial. Se pesó una cantidad adecuada de muestra y la misma se colocó en un balón de 500 ml. Posteriormente, se agregaron 100 ml de agua y 20 ml de la solución de HCl δ: 1,125 g/mL. El balón se conectó a un refrigerante y se calentó a reflujo durante 30 min. Una vez transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar y todo el contenido del balón se trasvasó a un matraz aforado de 500,00 ml. Se agitó y se filtró por papel, desechando las primeras gotas. Se realizaron diluciones apropiadas del filtrado.

Determinación: Se colocaron 0,2 ml de la dilución a ensayar en un tubo Hatch con tapa y se agregaron 2 ml de reactivo de Antrona. Se tapó el tubo firmemente, se agitó en vórtex para mezclar el contenido y luego se colocaron todos los tubos un baño de agua a temperatura ambiente para equilibrar la temperatura. Posteriormente, los mismos fueron colocados en un baño de agua a ebullición durante 15 min. Una vez transcurrido ese tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente en un baño de agua en oscuridad por aproximadamente 30 min. Finalmente, se midió la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro Hach DR/2000 (Hach Company, USA). Paralelamente se realizó una curva de calibración con una solución de glucosa estándar.

Todas las muestras se ensayaron por duplicado.

La cantidad de hidratos de carbono totales de cada muestra se expresó como g glucosa/100 g de harina de algas.

VI. Determinación de fibra dietaria total

La determinación se llevó a cabo mediante un ensayo basado en el método 32-05.01 de la AACC y el método 985.29 de la AOAC (1990) usando el kit Magazine (Megazyme International Ireland Ltd., Bray, County Wicklow, Irlanda).

Para la preparación de la muestra se siguieron los siguientes pasos: Se pesó 1 g de muestra, por duplicado, en vasos de precipitado de 400 ml. Se añadieron 50 ml de buffer fosfato (pH 6.0) a cada vaso y se ajustó el pH $6,0 \pm 0,1$. Luego, se añadieron 50 μ l de α -amilasa estable al calor, se cubrieron los vasos con papel aluminio y se incubaron en un baño con agua hirviendo por 30 min. Una vez transcurrido ese tiempo, las soluciones se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y se ajustó el pH a $7,5 \pm 0,1$ mediante el agregado de 10 ml de una solución de NaOH 0,275 N. Luego, a cada vaso se agregaron 100 μ l de proteasa, se cubrieron los mismos con papel aluminio y se incubaron a 60°C con agitación continua por 30 min. Pasado ese tiempo, se dejaron enfriar y se agregaron 10 ml de una solución 0,325 N de HCl. Se ajustó el pH a $4,5 \pm 0,2$ y se agregaron 200 μ l de amiloglucosidasa. Los vasos se volvieron a cubrir con papel aluminio y se incubaron por 30 min. más en un baño a 60°C con continua agitación. Para precipitar la fibra de la muestra, se agregaron 280 ml de etanol 96% precalentado a 60°C, y se dejó precipitar por 1h.

Filtrado de la muestra: Se utilizaron filtros de vidrio fritado con 1 g de Celite, previamente secados en estufa por 2 h a 130 °C y pesados. Los vasos fueron colocados en un kitasato conectado a un manómetro y éste a una bomba de vacío. Todo el contenido de los vasos

de 400 ml fue filtrado y luego se procedió al lavado de la muestra remanente en el filtro con 20 ml de etanol 78% (3 veces), 10 ml de etanol 96% (2 veces) y 10 ml de acetona (2 veces).

Una vez realizado todo esto, los filtros que contenían los residuos se secaron una noche en estufa a 70°C, luego se enfriaron y pesaron. Por diferencia se determinó el peso del residuo. Para cada muestra, sobre uno de los residuos se determinó el contenido remanente de cenizas y al otro, el de proteínas, cada uno por los métodos descritos anteriormente (sección 3.2.4 (II) y 3.2.4 (III) respectivamente) para hacer la corrección correspondiente.

Los resultados se expresaron como g fibra dietaria total/100 g de harina de algas.

3.2.5 Determinación cuantitativa de clorofilas y carotenoides

Preparación de los extractos: se pesaron aproximadamente 0,4 g de cada harina de algas en tubos Hatch y se procedió a la extracción de los pigmentos con 2,5 ml de una solución acetona/agua (80/20). El homogenato se agitó durante 15 segundos en vórtex y se centrifugó a 5500 g por 5 minutos. Se recogió el sobrenadante, y sobre el pellet se realizó una segunda extracción con la adición de 2,5 ml de la misma solución anterior.

El contenido de clorofilas y carotenoides totales fue determinado mediante un espectrofotómetro Hach DR/2000 (Hach Company, EE.UU) según Lichtenthaler (1987). Se midió la Absorbancia de los extractos a 663 nm, 647 nm y a 470 nm. La cantidad de cada pigmento en los extractos se calculó según las siguientes fórmulas ($\mu\text{g}/\text{ml}$ extracto):

$$\text{Clorofila "a":} \quad C_a = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{647}$$

$$\text{Clorofila "b":} \quad C_b = 21,50 \times A_{647} - 5,10 \times A_{663}$$

$$\text{Clorofilas totales (a+b):} \quad C_{a+b} = 7,15 \times A_{663} + 18,71 \times A_{647}$$

$$\text{Carotenoides totales:} \quad C_{x+c} = \frac{1000 \times A_{470} - 1,82 \times C_a - 85,02 \times C_b}{198}$$

Los resultados se expresaron como $\mu\text{g}/\text{g}$ harina de algas.

3.2.6 Determinación de polifenoles totales

El contenido de los compuestos fenólicos totales se determinó empleando el reactivo de Folin Ciocalteu (F-C) (mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico en medio básico) que oxida a los compuesto fenólicos originando óxidos azules de wolframio y molibdeno, los cuales son determinados espectrofotométricamente.

Preparación de los extractos: Se pesaron 0,5 g de cada harina de algas en frascos pequeños y se agregaron 5 ml de etanol 96%. La extracción se realizó con agitación continua, en oscuridad a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente se transfirieron los extractos a tubos eppendorff y centrifugaron a 3000 g por 15 min a 4°C. La extracción se realizó sobre cada muestra por duplicado.

Para la determinación, se colocaron 0,2 ml de cada sobrenadante en tubo Hatch y se adicionaron 2 ml de una solución de Na₂CO₃ 2% (p/v) (en oscuridad). Pasados 2 minutos, se agregaron 0,2 ml de reactivo de F-C diluido 1:1 en agua, se agitó en vórtex y se dejó reaccionar cada muestra en oscuridad por 30 minutos. Por último, se leyó la absorbancia a 725 nm. En simultáneo se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico como patrón.

Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/g harina de algas.

3.2.7 Determinación de la capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó mediante dos métodos: el método de DPPH[•] y el método de ABTS^{•+}.

Preparación de los extractos: se obtuvieron extractos etanólicos a partir de 0,5 g de cada harina de algas y 5 ml de etanol 96% en frascos pequeños resguardados de la luz con agitación continua durante 2 h. Luego, el contenido de cada frasco se fraccionó en eppendorff, los cuales fueron centrifugados a 7000 rpm por 10 minutos. Se descartó el pellet y los ensayos se realizaron sobre el sobrenadante resultante.

Determinación del tiempo de reacción: Para cada uno de los métodos se realizó una cinética de reacción con el fin de determinar el tiempo de medida, ya que los tiempos de reacción encontrados en bibliografía fueron muy variables, por lo cual para la realización de estos ensayos tubo que asegurarse una reacción completa.

I. Ensayo de DPPH[•]

La técnica se basa en la reacción de compuestos con supuesta actividad antioxidante con el radical libre 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH[•]) en solución metanólica. La forma estable del DPPH[•] (que posee un color violeta) absorbe a una longitud de onda de 515 nm, y al ser reducido por un compuesto antioxidante (AH) u otra especie radical (R[•]) la absorción disminuye (la solución se torna amarillo), representando la capacidad antioxidante total del compuesto ensayado. En este estudio se usó el protocolo de Brand Williams y col., (1995) con modificaciones. Se empleó como solvente y medio de reacción

etanol 96% en lugar de metanol ya que otros autores demostraron que no existían mayores diferencias entre ambos solventes.

Reactivo: El reactivo de DPPH[•] se preparó utilizando una concentración de 25 mg DPPH[•]/L en etanol. Para ello, se pesó el polvo y se lo disolvió con etanol 96% en un baño agua-hielo con agitación.

Estudio de la cinética de reacción: se colocaron 0,1 ml de extracto etanólico y 3,9 ml de reactivo DPPH[•] en una cubeta de vidrio y rápidamente se leyó la absorbancia a 515 nm cada 10-20 min durante 4 h y una última medida a las 24 h, en espectrofotómetro Hatch DR/2000 (Hach Company, USA). Paralelamente se determinó un blanco (cubeta con únicamente 4 ml de reactivo)

Determinación sobre los extractos: se colocaron 0,1 ml de extracto etanólico y 3,9 ml DPPH[•] en tubos Hatch envueltos en papel aluminio para resguardarlos de la luz. Se agitaron y se incubaron a 20°C durante 24 h (tiempo de reacción establecido según cinética). Una vez transcurrido ese tiempo, se leyó la absorbancia a 515 nm.

En simultáneo, se realizó una curva de calibración utilizando TROLOX (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

Se expresó la capacidad antioxidante en equivalentes TROLOX, medido en μmol TROLOX/ g harina de algas.

II. Ensayo de ABTS^{•+}

Reactivo: para preparar la solución stock de ABTS^{•+}, se pesaron 0,096 g de sal de amonio de ABTS^{•+} y 0,0165 g de K₂S₂O₈. Con un matraz aforado, se llevó a 25 ml con agua destilada. Para preparar la solución de trabajo de ABTS^{•+}, se realizó una dilución de la solución stock para obtener una absorbancia de $0,70 \pm 0,03$ a 734 nm.

Estudio de la cinética de reacción: se colocaron 60 μl del extracto etanólico y 3 ml de la solución de trabajo de ABTS^{•+} en una cubeta de vidrio y se leyó la absorbancia a 734 nm cada 5 min durante 4 h en el espectrofotómetro Hach DR/2000 (Hach Company, EE.UU). Paralelamente se determinó un blanco (cubeta con únicamente 3 ml de la solución de ABTS^{•+}).

Determinación sobre los extractos: Para realizar el ensayo se agregaron 60 μl de extracto etanólico en tubos Hatch y se añadieron 3 ml de la solución de trabajo de ABTS^{•+}. La mezcla se incubó 3 h en oscuridad (tiempo de reacción establecido según cinética). Una vez transcurrido ese tiempo, se midió la absorbancia a 734 nm.

En simultáneo, se realizó una curva de calibración del antioxidante de referencia TROLOX, con concentraciones desde 0 μM hasta 1000 μM usando etanol 96% como solvente.

La capacidad antioxidante se expresó de la misma manera que para el ensayo de DPPH \cdot : en $\mu\text{mol TROLOX/ g}$ harina de algas.

PARTE II: Aplicación de las harinas de algas marinas en productos cárnicos

3.3 Materias primas

Se utilizó nalga de origen porcino adquirida en comercio local. Este corte del cuarto trasero puede considerarse magro, con un 2% de grasas totales (García, INTA Castelar) cubierta por una fina capa de grasa exterior. Además se utilizaron las siguientes materias primas para completar la formulación de las hamburguesas:

- Agua destilada.
- Aceite de girasol de alto oleico (C 18:1, 82,6%, Granix S.A. Vicente López, Argentina), elegida como fuente de ácidos grasos n-9.
- Tripolifosfato de sodio (TTP).
- Cloruro de sodio (NaCl).
- Solución de colorante natural rojo carmín (Nat-Car-01, Naturis S.A, Buenos Aires, Argentina).

Como ligante/emulsificante se compararon las harinas de algas con un concentrado de proteínas de leche (MPC) (80% proteína, Milkaut, Santa Fé, Argentina).

Todos los ingredientes o aditivos utilizados fueron de grado alimentario.

3.4 Diseño experimental

Para la formulación de las hamburguesas con harina de algas marinas se tomó como formulación control base a la descrita por Ranalli (2009). Las formulaciones se describen a continuación (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Formulación de hamburguesas de cerdo: con proteínas de leche (MPC), con harina de *Undaria* sp. (UND)

Componente	MPC	UND
	g/100 g de formulación cruda	
Carne	75,8	75.8
Concentrado de proteínas de leche	3	-
Harina de algas <i>Undaria</i> sp.	-	3
Agua	10	9
Aceite de girasol de alto oleico	10	10
Rojo carmín	-	1
TPP	0,2	0,2
NaCl	1	1

3.5 Elaboración de las hamburguesas

Para la elaboración de las hamburguesas, primero se acondicionaron todas las piezas de carne antes del picado, retirando el tejido conectivo y grasa visible con utensilios previamente sanitizados con alcohol 70%. El picado se realizó en una picadora comercial manual con plato, con orificios de 0,95 cm diámetro (Meifa32, Buenos Aires, Argentina), también sanitizada, donde se agregó la carne previamente cortada en trozos. Una vez picada la carne, ésta se fraccionó en bolsas de polietileno con cierre hermético y se congeló a -20°C.

Para la elaboración de las hamburguesas, la carne se descongeló en heladera 24 horas antes de su utilización. Por un lado, se colocó la carne en una procesadora comercial (Universo, Rowenta, Alemania) y junto a ella se agregaron la sal, y el TPP.

Por otro lado, se mezcló el ligante/emulsificante (MPC o harina de algas, según formulación) con el agua a 4°C durante 30 segundos con homogeneizador manual (Minipimer MR 390G Braun, Alemania) y se dejó en contacto 10 minutos para su correcta hidratación. Transcurrido ese tiempo, se agregó el aceite de girasol de alto oleico y se emulsionó 1,5 minutos más utilizando el mismo homogeneizador. La emulsión obtenida se incorporó a la mezcla de carne y sales, mezclando a velocidad media durante 4 minutos en la procesadora.

La mezcla obtenida se refrigeró a 4°C durante 1 h. Se armaron hamburguesas de 40±1 g utilizando un molde circular (diámetro 5 cm, altura 1,2 cm), se colocaron en bandejas de aluminio, con separadores y se envasaron en bolsas de polietileno con cierre hermético.

3.6 Almacenamiento congelado

Las hamburguesas se almacenaron crudas congeladas a -20°C durante 6 meses. Periódicamente se extrajeron muestras de forma aleatoria de cada formulación y se realizaron los ensayos que se describen a continuación luego de su cocción en plancha calefactora de doble contacto (Modelo 3882, Oster, China) precalentada durante 30 minutos. El precalentamiento se realizó con el fin de asegurar que la plancha siempre alcance la temperatura máxima (210°C) en la superficie de las mismas antes de colocar las hamburguesas.

El tiempo de cocción de las hamburguesas congeladas se determinó como el tiempo necesario para que el centro de las mismas alcanzara y se mantuviera a 73°C por 15 s, con el fin de asegurar la inocuidad microbiológica del producto. La correcta cocción de las hamburguesas con esta plancha se logró en 3 minutos.

Una vez cocidas, las muestras se dejaron enfriar en bandejas de aluminio con papel absorbente a temperatura ambiente, 6 minutos de cada lado.

3.7 Determinaciones realizadas durante el almacenamiento congelado

3.7.1 Rendimiento

El rendimiento de los productos de cada formulación se determinó, por quintuplicado, a diferentes tiempos de almacenamiento a partir de la diferencia de peso antes y después de la cocción. Se utilizó una balanza analítica para realizar las medidas de peso de las hamburguesas crudas congeladas ($g_{\text{Hamburguesa cruda}}$) y, luego de la cocción, una vez frías, se pesaron nuevamente ($g_{\text{Hamburguesa cocida}}$).

El rendimiento se calculó según la fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{g_{\text{Hamburguesa cocida}}}{g_{\text{Hamburguesa cruda}}} \right) \times 100$$

3.7.2 Encogimiento

El encogimiento de los productos de cada formulación por el proceso de cocción se determinó, como en el caso anterior, por quintuplicado, a los diferentes tiempos de almacenamiento. Para el cálculo, fue necesario determinar el espesor y el diámetro de cada muestra antes y después de la cocción, empleando un calibre digital.

El encogimiento se calculó según la fórmula:

$$\text{Encogimiento (\%)} = \left(\frac{(\text{Espesor crudo} - \text{espesor cocido}) + (\text{diámetro crudo} - \text{diámetro cocido})}{\text{Espesor crudo} + \text{diámetro crudo}} \right) \times 100$$

3.7.3 Jugosidad por presión

La jugosidad se definió como el porcentaje de líquido extraído de hamburguesas enteras cocidas sometidas a una determinada presión por un tiempo fijo.

Para su determinación, fue necesario que cada muestra, entera, cocida y previamente pesadas a temperatura ambiente, sea colocada entre dos láminas de papel de filtro de 10x10 cm, recubiertas por 2 láminas de papel aluminio de las mismas dimensiones, previamente pesadas (*Peso papeles inicial*). Se utilizó un texturómetro TA-xt2i (Texture analyzer, Stable Micro Systems, UK) que fue programado para ejercer una presión de 100 N durante 2 minutos (Zorrilla y col., 2000) sobre cada muestra. Las láminas de papel de filtro junto a las de papel aluminio fueron pesadas después del ensayo (*Peso papeles final*). La determinación se realizó por triplicado.

La jugosidad se calculó según la fórmula:

$$\text{Jugosidad} = \left(\frac{\text{Peso papeles final} - \text{Peso papeles inicial}}{\text{Peso hamburguesa cocida}} \right) \times 100$$

3.7.4 Análisis de perfil de textura (TPA)

El análisis de perfil de textura es una metodología objetiva, que presenta buena correlación con las evaluaciones de textura realizadas por paneles sensoriales entrenados. Este tipo de análisis es una evaluación que en cierto modo imita el proceso de masticación, por lo cual suele clasificarse como un test imitativo.

El ensayo de TPA consta de dos ciclos de compresión entre los platos planos del equipo separados por un tiempo de espera. Una gráfica general del análisis de perfil de textura es como la siguiente (Figura 3.3):

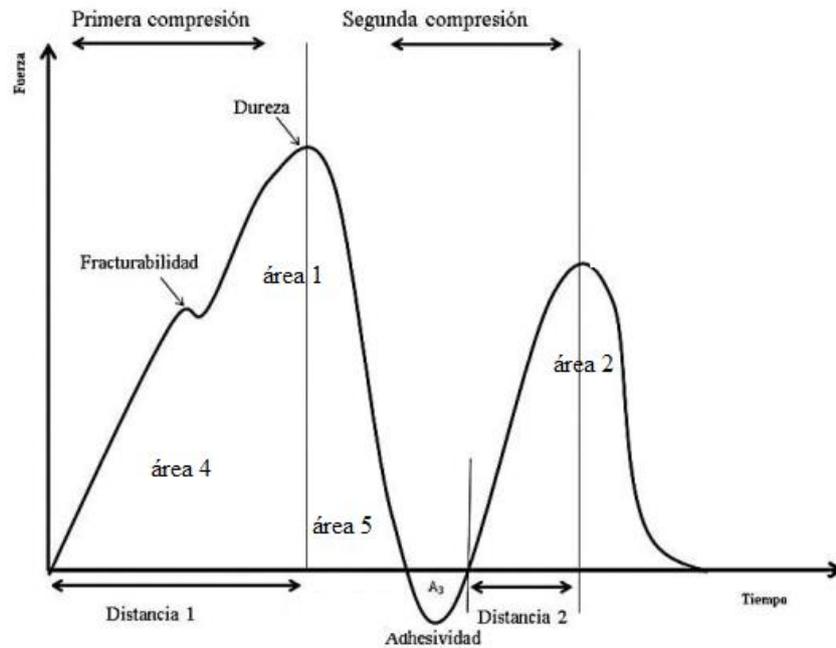


Figura 3.3: Gráfico de un Perfil de Textura modelo.

Para la realización del TPA se utilizó un texturómetro TA-xt2i acoplado con el programa Texture Expert. Se extrajeron de cada hamburguesa cocida, con sacabocados, 4 cilindros de 1,5 cm de diámetro y sobre cada uno de éstos se realizó el ensayo. Se utilizó una sonda de aluminio de 75 mm de diámetro. La compresión aplicada a cada muestra fue hasta el 30% de su altura original. El ensayo se realizó al menos ocho veces para cada formulación.

Los parámetros más relevantes que se pueden determinar del mismo son:

- **Dureza:** Fuerza necesaria para lograr una deformación determinada. Se determina como la máxima fuerza, en Newton, registrada durante el primer ciclo de compresión (Figura 3.3).
- **Adhesividad:** Trabajo necesario para vencer la fuerza de atracción entre la muestra y una superficie. Se determina a partir del área negativa después del primer ciclo de compresión. Representa el trabajo necesario para separar la superficie del equipo y la muestra.

- **Cohesividad:** representa la resistencia de un material a una segunda deformación con relación a como éste se comportó en un primer ciclo de deformación. Se determina como la relación entre el área positiva del segundo ciclo de compresión (A2) y el área positiva del primer ciclo (A1).
- **Elasticidad:** Es la capacidad que tiene una muestra deformada para recuperar su forma o longitud inicial después de que la fuerza ha impactado en ella. Se determina como el cociente de la distancia 2 y la distancia 1.
- **Masticabilidad:** Fuerza necesaria para masticar un alimento sólido hasta un estado tal que permita su ingesta. Se determina como el producto de la dureza, cohesividad y elasticidad.
- **Resilencia:** Representa el trabajo del material para recuperar su geometría inicial, se la puede interpretar como una elasticidad instantánea. Se calcula como $\frac{\text{área 5}}{\text{área 4}}$.

3.7.5 Color

La medida de color para de cada muestra se realizó con un colorímetro triestímulo Minolta CR-400 (Minolta Corp., Ramsey, New Jersey, EE.UU) (Figura 3.4a).

Las medidas de color se realizaron usando el sistema de la CIE (Commission International De l' Eclairage, 1976) donde las tres coordenadas de color fundamentales son L^* , a^* y b^* (Figura 3.4b).

- L^* : Luminosidad. L^* puede tomar valores que varían entre el 0 (negro) y el 100 (blanco).
- a^* : varía desde el color rojo (cuando toma valores positivos) al verde (cuando toma valores negativos).
- b^* : varía desde el amarillo (cuando toma valores positivos) al azul (cuando toma valores negativos).

Para la medición se utilizaron cilindros de hamburguesas cocidas de 1,5 cm de diámetro, los cuales se cortaron a la mitad, haciendo la medida sobre la superficie de la cara interna del cilindro (hamburguesa). Se realizaron 16 replicados por formulación.

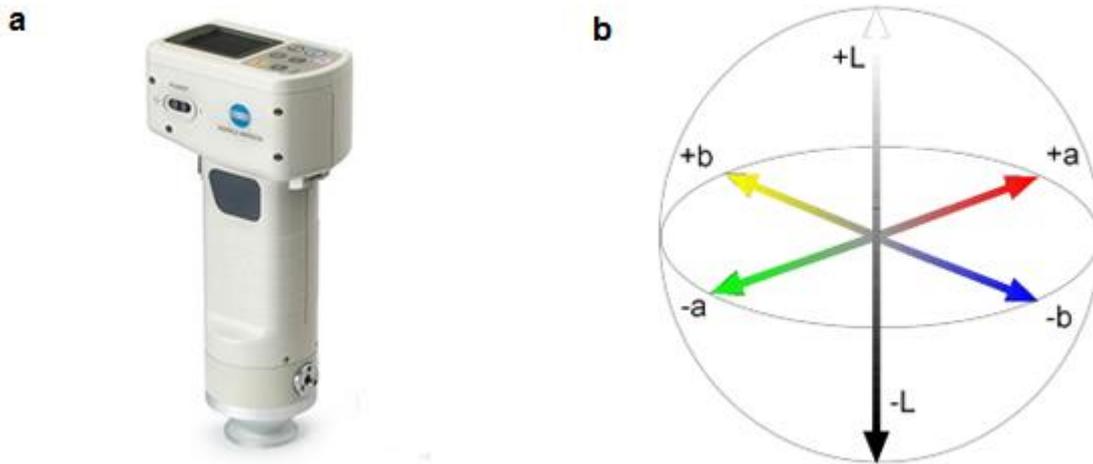


Figura 3.4: (a) Colorímetro Minolta Serie CR400; (b) Esquematación del sistema cromático CIELAB.

3.7.6 Oxidación lipídica

Para el monitoreo de la oxidación lipídica de las dos formulaciones de hamburguesas en el tiempo se escogió el método de las Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). Para su determinación se utilizó el método del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) según Andrés y col. (2009). Para su realización, se tomaron 2 g de cada una de las muestras cocidas trituradas y se prosiguió a la precipitación de las proteínas presentes y la solubilización de las TBARS con ácido tricloroacético (TCA) al 12%. La muestra junto al TCA se colocó en un baño de agua-hielo con agitación constante durante 30 minutos. Luego, se filtró por papel, se tomaron 2 ml de filtrado y se colocaron en un tubo con 2 ml del reactivo TBA 0,5% (preparado en el día de su uso y sonicado por 30 minutos). Los tubos se incubaron en un baño termostático a 70°C por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se enfriaron los tubos bajo canilla y se midió la absorbancia a 523 nm en un espectrofotómetro Hach DR/2000 (Hach Company, EE.UU).

Las TBARS se calcularon según la siguiente fórmula, y se expresan como mg malonaldehído (MDA)/Kg producto:

$$N^{\circ} TBARS = \frac{PM * Vf * A * 4 * 1000}{Val * \epsilon * m * b}$$

Dónde:

PM: masa molecular del malonaldehído (72 g).

Vf: volumen del filtrado (16 ml).

Val: volumen de la alícuota (2 ml).

ϵ : Coeficiente de extinción molar del complejo coloreado ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$).

b: camino óptico (1 cm).

m: masa de la muestra.

A: Absorbancia a 523 nm.

3.8 Otras determinaciones realizadas

3.8.1 Recuentos microbianos

El recuento microbiano se realizó empleando la técnica de recuento en placa sobre las dos formulaciones de hamburguesas crudas en dos situaciones diferentes:

1. Hamburguesas envasadas en polietileno y refrigeradas (4°C), en los tiempos inicial, 7 días y 10 días.
2. Hamburguesas envasadas en polietileno y congeladas a -20°C .

Bajo flujo laminar, se tomaron 10 g de muestra y se homogeneizaron en 90 ml de peptona 0,1% en Stomacher (West Sussex, Reino Unido) durante 60 segundos a velocidad normal. Se realizaron diluciones seriadas de las diferentes muestras en tubos con peptona 0,1%. Luego se sembró en profundidad, 1 ml de las diluciones correspondientes en el medio de cultivo correspondiente, por duplicado.

Para la siembra en profundidad primero se fundieron los medios y cuando éstos llegaron a una temperatura aproximada de 37°C se procedió a la siembra. Para ello, se tomó 1 ml de la dilución a sembrar y se colocó en una placa de petri estéril, arriba del cual se volcó el medio de cultivo fundido, se homogenizó mediante movimientos circulares de la placa, y se dejó solidificar por 10 min aproximadamente (Figura 3.5). La incubación se realizó en forma invertida a la temperatura correspondiente.

Medios utilizados:

- Plate Count Agar (PCA): es un medio que se utiliza para el recuento de microorganismos mesófilos totales (incubando a 30°C durante 48 h). El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en condiciones establecidas, estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. Refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, indicando además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración.
- Agar Cloranfenicol, Extracto de levadura, Glucosa (YGC): es un medio selectivo para hongos y levaduras. La importancia de la presencia de éstas en los alimentos

está determinada por la capacidad de producir diferentes grados de deterioro y descomposición de los mismos. Las placas sembradas se incubaron a 30°C por 48 h.

- Agar de Man Rogosa and Sharpe (MRS): es un medio selectivo que se utiliza para el recuento de *Lactobacillus* sp. Las placas sembradas se incubaron a 30°C por 48 h.
- Agar bilis Rojo Verde Brillante (ABRV): es un medio que se utiliza para la detección o enumeración del grupo *Enterobacteriaceae* en alimentos. Este grupo incluye a las bacterias coliformes fermentadoras de lactosa, cepas de *E. coli* no fermentadoras de lactosa y especies no fermentadoras de lactosa tales como *Salmonella* y *Shigella*.



Figura 3.5: Placas sembradas en profundidad con la dilución y medio correspondiente en flujo laminar.

Los resultados obtenidos fueron expresados como log UFC/g hamburguesa cruda para los diferentes microorganismos analizados.

Durante el **almacenamiento refrigerado** a 4°C también se realizó el ensayo de **TBARS** sobre las dos formulaciones crudas como se describió en la sección 3.7.6 en los tiempos inicial, 7 días y 10 días.

3.8.2 Determinación de la capacidad antioxidante

Preparación de los extractos: Se realizaron los extractos siguiendo el protocolo de Mancini y col (2015). Se pesaron 5 g de hamburguesa cocida y picada en tubo Falcon recubierto con papel aluminio. Luego, se agregaron 10 ml de etanol 96% y se agitó a velocidad máxima en vórtex por 2 minutos. El líquido se transfirió a tubos eppendorf que fueron centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos. Se descartó el precipitado y se trabajó con el sobrenadante. Los extractos se realizaron por duplicado para cada formulación.

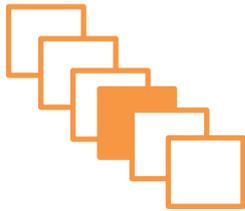
La determinación de la capacidad antioxidante de las hamburguesas se determinó mediante los ensayos de DPPH[•] y ABTS^{•+} ya descritos (sección 3.2.7).

3.8.3 Contenido lipídico y perfil de ácidos grasos

La determinación del contenido lipídico y del perfil de ácidos grasos se realizó sobre ambas formulaciones de hamburguesas cocidas después de 6 meses de almacenamiento. El procedimiento que se utilizó es el mismo descrito en sección 3.2.4 (IV), con la diferencia que las hamburguesas picadas fueron mezcladas con sulfato de sodio anhidro como desecante para poder realizar la extracción mediante el método de Soxhlet.

3.9 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANAVA) para todas las variables dependientes analizadas. Los factores considerados fueron el género de las algas de las harinas estudiadas, la formulación y el tiempo de almacenamiento según corresponda. Para las comparaciones pareadas simultáneas se eligió el test LSD, considerando un nivel de significación de $p < 0,05$. Se utilizó el programa SYSTAT (SYSTAT, Inc., Evanston, IT).



4. Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE I: Estudio y caracterización de harinas de algas marinas comestibles

Las algas marinas contienen una gran cantidad de agua. En estado fresco, contienen 75-85% de agua y 15-25% de componentes orgánicos y minerales. Debido a ello, son altamente perecederas y podrían deteriorarse pocos días después de la cosecha. Para evitar esto, el secado es un paso esencial antes de que puedan ser utilizadas en el procesamiento industrial. El secado disminuye la actividad del agua, lo que finalmente retarda el crecimiento microbiano, ayuda a conservar las cualidades deseables y reduce el volumen de almacenamiento. En la actualidad, las algas marinas se venden en tiendas de productos saludables en forma seca. Las algas marinas secas pueden usarse como parte de una ensalada de vegetales crudos, como condimento natural o como refrigerio con jugo fresco (Gupta y col., 2011).

4.1 Actividad acuosa

Si bien el contenido de agua de un alimento es un parámetro que puede dar idea acerca de su estabilidad frente al deterioro, la estabilidad, sanidad y otras propiedades pueden predecirse de forma más certera a partir de la actividad acuosa (a_w) que en función del contenido de agua. Esta situación se atribuye, en parte, a diferencias en la intensidad con que el agua se asocia con los constituyentes no acuosos; el agua implicada en asociaciones fuertes es menos susceptible o propensa para las actividades degradativas, tales como el crecimiento de microorganismos y las reacciones químicas de hidrólisis, que el agua débilmente asociada. Por lo tanto, el término de a_w surgió para tener en cuenta la intensidad con que el agua se asocia a los diferentes componentes no acuosos.

Los resultados obtenidos para la a_w de las harinas de algas se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Actividad acuosa (a_w) a 25 °C de harinas de algas marinas estudiadas.

Harina de algas	a_w^*
<i>Undaria</i> sp.	0,5495 ^c (0,0005)
<i>Porphyra</i> sp.	0,5880 ^a (0,0050)
<i>Ulva</i> sp.	0,5680 ^b (0,0030)

*Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según ensayo LSD. Errores estándar de las medias se muestran entre paréntesis.

Valores de a_w de 0,50 o inferiores inhiben la proliferación microbiana (Beuchat, 1981). Por otro lado, valores de a_w menores de 0,51 disminuyeron la oxidación lipídica y degradación de polifenoles en estudios de láminas de *Porphyra* deshidratada y almacenadas a 40 °C (Choe y Oh, 2013). Los valores obtenidos de a_w para las harinas de algas estudiadas son considerablemente bajos (0,545 – 0,588) y difieren significativamente entre géneros. Esto da indicio de que el agua que posee en su matriz no estaría tan disponible para su utilización, lo que se traduciría en una estabilidad frente a contaminantes biológicos, pudiendo retardar el crecimiento microbiano, así como la oxidación lipídica o de compuestos antioxidantes.

4.2 Tamaño de partícula

La evaluación de las distribuciones de tamaño de partícula se lleva a cabo, por lo general, en una amplia gama de industrias y con frecuencia constituye un parámetro crítico en la fabricación de muchos productos. El tamaño de partícula tiene influencia directa sobre las propiedades del material, tales como textura y tacto, apariencia, fluidez y manipulación. La medición de las distribuciones de tamaño de partícula y la comprensión de la forma en que afectan a los productos y procesos pueden ser elementos vitales para el éxito de muchos procesos de fabricación. La Figura 4.1 muestra la distribución en volumen de tamaño de partícula para las tres harinas de algas analizadas, para las dos condiciones ensayadas: con y sin sonicación. Asimismo, en la Tabla 4.2 se presentan las distribuciones expresadas en frecuencia de volumen. Todas las distribuciones mostraron una sola población mayoritaria (monomodales), además en todos los casos se encontró una pequeña población que se aprecia en forma de hombro.

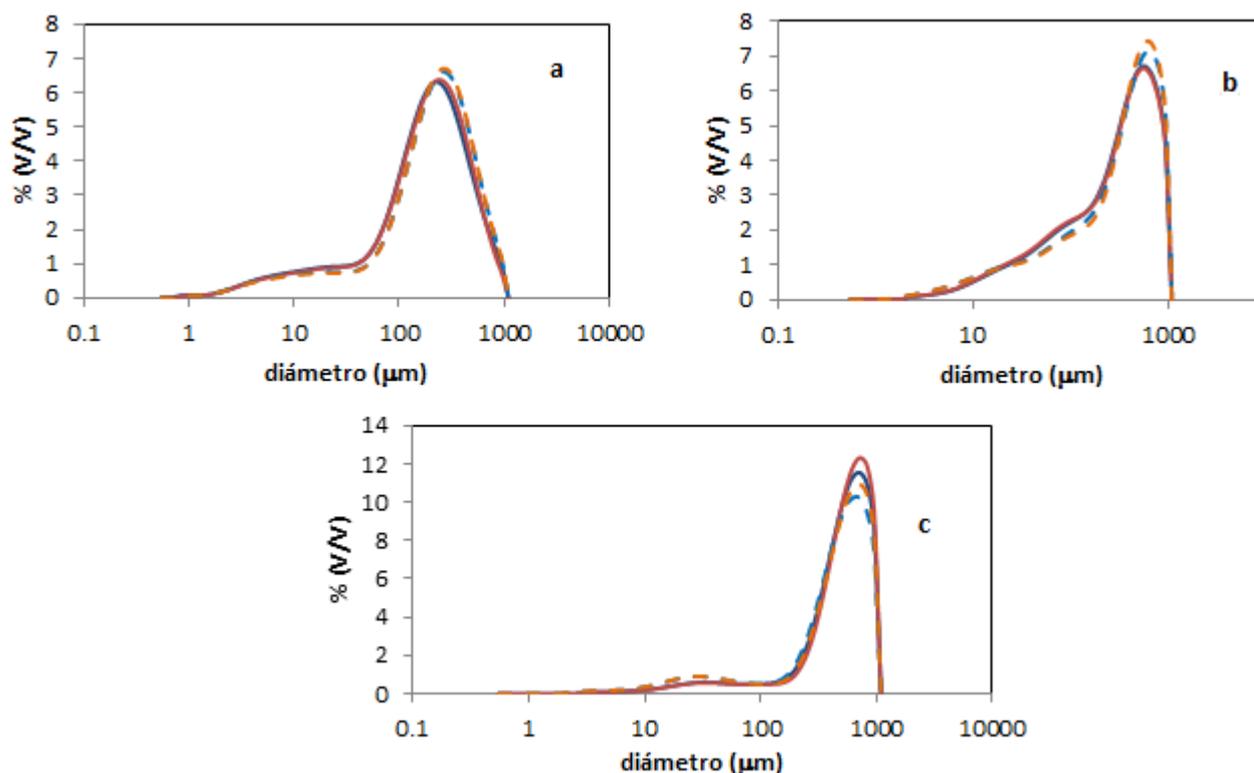


Figura 4.1: Distribución de tamaño de partículas para harinas de algas marinas: (a) *Ulva* sp.; (b) *Undaria* sp.; (c) *Porphyra* sp. (—) no sonicadas, (---) sonicadas.

Tabla 4.2: Valores medios de Dv10, Dv50 y Dv90 para las tres harinas de algas analizadas: NS: no sonicadas, S: sonicadas.

Harina de algas	Dv10* (µm)	Dv50* (µm)	Dv90* (µm)
<i>Undaria</i> sp. NS	30,0 ^c (0,6)	295 ^d (2)	721 ^d (6)
<i>Undaria</i> sp. S	24,9 ^{cd} (0,5)	329 ^c (6)	747 ^c (5)
<i>Porphyra</i> sp. NS	127,2 ^a (8,9)	509 ^a (5)	822 ^a (2)
<i>Porphyra</i> sp. S	43,6 ^b (3,3)	469 ^b (5)	805 ^b (2)
<i>Ulva</i> sp. NS	17,4 ^d (0,4)	175 ^f (2)	471 ^f (9)
<i>Ulva</i> sp. S	20,2 ^{cd} (0,4)	200 ^e (2)	513 ^e (4)

*Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según ensayo LSD. El error estándar se muestra entre paréntesis.

El análisis de varianza para los tres diámetros (Dv10, Dv50 y Dv90) indicó que la género, la sonicación y la interacción género x sonicación fueron significativos para el Dv10 y el Dv90, mientras que el efecto de la género y la interacción muestra x sonicación fueron significativos para el Dv50. Los menores diámetros correspondieron al género *Ulva* sp., mientras que *Porphyra* sp. sin sonicar tuvo los mayores valores para los tres diámetros

analizados. El efecto de la sonicación provocó una disminución en los tres diámetros de la harina del género *Porphyra* sp., indicando una posible aglomeración de la misma tras su obtención.

4.3 Composición centesimal

Los resultados obtenidos del análisis de composición de las diferentes harinas de algas estudiadas (humedad, proteínas, lípidos, hidratos de carbono totales, cenizas y fibra dietaria total) se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Composición porcentual (% base húmeda) de las harinas de algas estudiadas.

Componente* (%)	<i>Undaria</i> sp.	<i>Porphyra</i> sp.	<i>Ulva</i> sp.
Humedad	7,93 ^b (0,24)	11,11 ^a (0,02)	11,43 ^a (0,03)
Proteínas	6,00 ^c (0,19)	18,10 ^a (0,08)	8,37 ^b (0,50)
Lípidos	4,81 ^a (0,14)	0,19 ^b (0,02)	0,39 ^b (0,01)
Hidratos de carbono	5,9 ^c (0,2)	27,6 ^a (0,4)	20,0 ^b (0,4)
Cenizas	24,4 ^b (0,2)	17,4 ^c (0,1)	31,9 ^a (0,3)
Fibra dietaria total	37,091 (0,004)	46,235 (8,103)	41,302 (0,699)

*Diferentes superíndices en la misma fila indican que los promedios difieren significativamente ($p < 0,05$) según ensayo LSD. Errores estándar de las medias se muestran entre paréntesis.

Los valores de **humedad** de las harinas de algas estudiadas fueron relativamente bajos, variando entre 7,9 y 11,5%. El género influyó significativamente sobre este parámetro, ya que el porcentaje de humedad obtenido para *Undaria* sp. fue menor que los obtenidos para *Porphyra* sp. y *Ulva* sp.. Estos valores resultaron adecuados dado que las diferentes algas fueron sometidas a un proceso de secado luego de su cosecha. Las técnicas de secado pueden tener varios efectos en las propiedades nutricionales, funcionales y biológicas de las algas. Sin embargo esto no fue evaluado ya que se recibieron y utilizaron directamente las harinas, las cuales una vez recibidas fueron almacenadas inmediatamente al vacío y congeladas para reducir posibles reacciones de deterioro.

Los bajos contenidos de humedad obtenidos para las diferentes harinas de algas podrían considerarse apropiados para la preservación de las harinas de algas con la posibilidad de ser almacenadas por largo tiempo, disminuyendo la posible alteración de su calidad, y cumplen con lo establecido en el Código Alimentario Argentino.

Las algas marinas poseen un elevado contenido mineral (8 – 40 % del peso seco) en comparación con los vegetales terrestres (Murata y col., 2001), ya que en la mayoría de las plantas el contenido en cenizas varía entre 5 y 10% del peso seco, lo que coloca a las algas como una importante fuente de minerales. Por lo tanto, las algas se pueden utilizar como suplemento alimentario para contribuir y alcanzar las cantidades diarias recomendadas de algunos macrominerales (Na, Ca, Mg, Cl⁻, SO₄⁻², P, principalmente) y elementos traza (I, Fe, Zn, Cu, Se, Mo, F⁻, Mn, B, Ni, Co) (Rupérez, 2002).

Según los resultados obtenidos, el porcentaje de **cenizas** varió entre 17,4 y 31,9 % en base húmeda (19,6 – 36,0 % base seca) y difieren significativamente según el género que se trate ($p < 0,05$). La harina de *Porphyra* sp. fue la que presentó el contenido más bajo en cenizas lo que coincide con otros estudios que ponen de manifiesto que las algas rojas presentan menores contenidos de cenizas respecto a las pardas (Kumar y col., 2015; Rupérez, 2002).

Las algas han sido utilizadas como una fuente de proteínas por varias décadas, especialmente en países desarrollados. Hoy en día se han convertido en una fuente alternativa de proteínas de alto valor biológico, debido a que poseen aminoácidos esenciales. El **contenido de proteínas** en algas se ve influenciado por diversos factores y puede variar mucho entre los grandes grupos, siendo en algas pardas generalmente bajo (5 – 24% del peso seco), mientras rojas y verdes presentan un contenido mayor (10 – 47 % del peso seco) (Mohamed y col., 2012). Esto se condice con los resultados obtenidos, ya que *Undaria* sp. (alga parda) presentó el valor más bajo de proteínas, seguido por *Ulva* sp. (alga verde) y *Porphyra* sp. (alga roja), con diferencias significativas entre géneros. A su vez, estos resultados coinciden con otros estudios, en los que las algas rojas, como el nori (nombre coloquial de *Porphyra* sp.) se han asociado a niveles altos de proteínas, mientras que las algas pardas se han relacionado con contenidos proteicos menores del 15%, excepto el Wakame (fracción de la lámina de *Undaria pinnatifida*) que suele contener niveles mayores (Fleurence, 1999; Kumar y col., 2015; Kunio y col., 2000; Peinado y col., 2014; Sánchez - Machado y col., 2004).

El contenido de polisacáridos de algas marinas puede alcanzar 76% aunque generalmente promedia el 50%, y está influenciado por varios factores biológicos, físicos y ambientales. Por ejemplo, el período de cosecha, la especie de algas y el protocolo de extracción influyen en los rendimientos de polisacáridos y sus estructuras.

Las algas, dependiendo del género y especie que se trate, pueden poseer en su composición hidratos de carbono de bajo peso molecular, polímeros de reserva y una gran cantidad de polisacáridos complejos presentes en la pared celular, tales como celulosa, hemicelulosa y fibra. Dentro de la fibra, hidrocoloides como alginatos, agar, carragenanos, fucoidanos y laminarianos están presentes en gran proporción. Esta gran diversidad de compuestos entre géneros de algas se ejemplifica en la Tabla 4.4, presentando los principales grupos de polisacáridos de pared, de reserva e hidratos de bajo peso molecular que se han descrito en cada uno de ellos (Rioux y Turgeon, 2015).

Tabla 4.4. Principales polisacáridos e hidratos de bajo PM en diferentes géneros de algas marinas (% base seca) (Rioux y Turgeon, 2015).

	<i>Ulva</i> sp.	<i>Undaria</i> sp.	<i>Porphyra</i> sp.
<i>Polisacáridos de reserva</i>	Almidón (en gránulos dentro de cloroplastos)	Laminarianos (en vacuolas dentro de cloroplastos)	Almidón florideano (en citoplasma)
<i>Hidratos de carbono de bajo PM</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Manitol ▪ Sacarosa 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Manitol 	
<i>Polisacáridos de pared</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Celulosa (19-41 %) ▪ Hemicelulosa ▪ Ulvanos (8-29%) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fucanos sulfatados y alginatos (45 %) ▪ Celulosa (1-8 %) ▪ Hemicelulosa 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Galactanos sulfatados (agar y carragenanos) ▪ Celulosa (3,5%) ▪ Xilanos ▪ Mananos ▪ Hemicelulosa (glucomananos, glucanos sulfatados)

El contenido de **hidratos de carbono totales** determinados por Antrona (Tabla 4.3) de las diferentes harinas de algas estudiadas difirió significativamente con el género. Como se puede observar, *Porphyra* sp. y *Ulva* sp. fueron aquellas que mayor porcentaje alcanzaron (alrededor del 20%), mientras que para *Undaria* sp. el valor obtenido fue notablemente inferior. Esto puede atribuirse a las diferencias mencionadas entre géneros para los

principales polisacáridos e hidratos en cada uno (Tabla 4.4): *Undaria* sp. no posee almidón entre sus hidratos de carbono principales, determinándose posiblemente mediante el método de Antrona monómeros de polisacáridos, generados por la hidrólisis ácida, principalmente de laminarianos (compuestos por cadenas de unidades de (1,3)-b-D-glucosa) (Barry, 1939) con ramificaciones que contienen unidades (1,6)-b-D-glicósido (Peat y col., 1958) y (1,2)-b-d-glicósido (Rioux y col., 2010), o de fucanos sulfatados y alginatos (Kloareg y Quatrano, 1988).

Los mayores valores de hidratos de carbono totales determinados para *Porphyra* sp. y *Ulva* sp. se correspondieron con los mayores contenidos de almidón como polisacárido de reserva citados en bibliografía (Tabla 4.4). Además, se ha demostrado que las algas verdes, como *Ulva* sp., poseen manitol y sacarosa, y ulvanos sulfatados (polisacárido compuesto principalmente por L-ramnosa, D-xilosa, D-glucosa y ácido D- glucurónico (Brading y col., 1954)) que también son cuantificados por el método empleado. En forma análoga, para la *Porphyra* sp., además del almidón, se cuantificaron por el método de Antrona sus polímeros de pared como galactanos sulfatados (agar, alginatos), xilanos, y mananos.

Las algas son generalmente reconocidas como buenas fuentes de fibra debido a su alto contenido de polisacáridos no digeribles. El término fibra dietaria generalmente hace referencia a carbohidratos no digeribles de origen dietario, que atraviesan intactos el intestino delgado pudiendo ser total o parcialmente fermentados en el intestino grueso. Es una mezcla compleja de entidades químicas, y su concentración y composición en diferentes fuentes no son constantes ni uniformes. El interés en la fibra de algas radica por un lado en su contenido, siendo éstos valores mayores que los encontrados en la mayoría de vegetales terrestres comestibles (Mabeau y col., 1993), y por otro, en su mayor contenido de fibra soluble (Dawczynski y col., 2007; Holdt y Kraan, 2011) la cual puede ser fermentada en alta proporción en el tracto gastrointestinal y sus principales propiedades se relacionan con disminución de colesterol y glucosa en sangre y desarrollo de microbiota intestinal (Cho y Drehar, 2001). De todos modos, estos contenidos son variable-dependientes y pueden aparecer fluctuaciones en función de la especie, la estación del año, zona geográfica, etc., lo cual dificulta a la hora de hacer estudios en conjunto de todas las macroalgas (Ordoñez, 2013).

Como se mencionó, las algas de diferentes géneros difieren en sus polisacáridos de reserva y de pared celular (Tabla 4.4). La fibra dietaria de las algas pardas se compone esencialmente de cuatro familias de polisacáridos: laminarianos, alginatos, fucanos y

celulosa. La celulosa, considerada como fibra insoluble, constituye las paredes celulares de algas pardas. Sin embargo, las paredes celulares de las algas rojas están compuestas de galactanos sulfatados (carragenanos y agar), xilanos, mananos y celulosa, mientras que su reserva de polisacáridos consiste principalmente en almidón. Las algas verdes contienen almidón, celulosa, xilanos, mananos y polisacáridos iónicos que contienen grupos sulfato y ácidos uránicos (ulvanos).

Según las determinaciones realizadas para las tres harinas de algas estudiadas se obtuvieron elevados contenidos de **fibra dietaria total**, variando entre 37 y 46 % en base húmeda (40,3 – 52,0% base seca), comparable a datos bibliográficos que mencionan para algas marinas niveles de fibra dietaria total entre 33 y 50% (base seca) (Lahaye, 1991; Rúperez y Saura-Calixto, 2001). Los valores no presentaron diferencias significativas entre géneros. El valor obtenido para *Porphyra* sp. en este trabajo fue mayor que el reportado por Palasí (2015), quien obtuvo un $34,8 \pm 0,8$ % (base seca) de fibra dietaria total. Sin embargo, para el caso del Wakame, el valor obtenido por Palasí (2015) fue de $38,8 \pm 0,5$ % (base seca), el cual es similar al obtenido para *Undaria* sp. en este trabajo.

Debido a esta diversidad de compuestos considerados a la vez hidratos de carbono y fibra dietaria y que algunos de ellos pueden determinarse con ambos métodos empleados, al realizar la suma de la totalidad de los macro componentes determinados (Tabla 4.3) se encontró un valor que supera el 100 % para las harinas de *Porphyra* sp. y *Ulva* sp.

El **contenido lipídico** en las algas marinas es minoritario, con niveles máximos informados para *Ulva* sp. 1,6 %, *Undaria* sp. 4,5 % y *Porphyra* sp. 2,8 % (base seca) (Roiux y Turgeon, 2015). Según los resultados obtenidos (Tabla 4.3), el porcentaje de lípidos para las tres harinas de algas estudiadas no superó el 5 % (en base húmeda), siendo el nivel para *Undaria* sp. entre 12 y 22 veces significativamente ($p < 0,05$) más alto que para *Ulva* sp. y *Porphyra* sp., respectivamente.

Si bien el contenido lipídico es bajo, resulta interesante conocer su perfil de ácidos grasos, ya que Peinado y col. (2014) y Sánchez-Machado y col., (2004) demostraron que las algas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y su aporte podría ser significativo.

Los resultados del **perfil de ácidos grasos** para las tres harinas de algas se muestran en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5: Perfil de ácidos grasos para harinas de algas de diferente género.

Ácido graso	Contenido de cada ácido graso (%) en harina de algas marinas*		
	<i>Undaria sp.</i>	<i>Porphyra sp.</i>	<i>Ulva sp.</i>
Ac. Mirístico (C14:0)	6,035 ^a	1,7 ^b	1,915 ^b
Ac. Pentadecanoico (C15:0)	0,27	-	-
Ac. Palmítico (C16:0)	37,105 ^c	59,29 ^a	53,975 ^b
Ac. Palmitoleico (C16:1)	2,035	3,04	2,67
Ac. Heptadecanoico (C17:0)	0,205	1,095	0,545
Ac. Cis-10-heptadecenoico (C17:1)	1,02	0,83	0,83
Ac. Esteárico (C18:0)	4,435 ^c	19,805 ^a	17,55 ^b
Ac. Oleico (C18:1 cis n9)	34,575 ^a	8,165 ^c	16,29 ^b
Ac. Linoleico (C18:2 cis n6)	4,405 ^a	1,775 ^c	2,205 ^b
Ac. γ-Linolénico (C18:3 n6)	1,01	-	-
Ac. α-Linolénico (C18:3 n3)	0,56	0,39	0,495
Ac. Eicosanoico (C20:0)	0,58	1,01	0,86
Ac. Eicosenoico (C20:1 n9)	0,55 ^b	1,25 ^a	1,395 ^a
Ac. Cis- 8,11,14-Eicosatrienoico (C20:3 n6)	4,61 ^a	0,515 ^b	-
Ac. Cis-11,14,17-Eicosatrienoico (C20:3 n3)	2,355	1,41	2,07

*Diferentes superíndices en la misma fila indican que las medias difieren significativamente ($p < 0,05$) según ensayo LSD.

Según los resultados obtenidos, se pudo observar que las algas presentaron principalmente ácidos grasos de entre 14 y 20 carbonos, saturados e insaturados. Con respecto a los ácidos grasos saturados, los que mayormente están presentes en las algas, pueden incluir ácido láurico (C12), ácido mirístico (C14), ácido pentadecanoico (C15), ácido palmítico (C16), ácido heptadecanoico (C17), ácido esteárico (C18) y ácido eicosanoico (C20) (Hamid y col., 2015).

Según los resultados obtenidos (Tabla 4.5), los perfiles de ácidos grasos de las harinas de algas presentaron diferencias entre los géneros, principalmente en la proporción de ácido palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) para los cuales *Porphyra sp.* y *Ulva sp.*

mostraron niveles mayores respecto a *Undaria* sp., mientras que esta última presentó mayor proporción de oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y γ -linolénico (C18:3 n6) respecto a los otros dos géneros. Se ha reportado que el ácido oleico es el principal MUFA en algas marinas y para *Undaria pinnatifida* (especie muy abundante dentro del género *Undaria*) puede representar el 22,64 % del ácido graso total (Khotimchenko, 2003; Sánchez-Machado y col., 2004). No obstante, el valor obtenido para el ácido oleico en la harina de *Undaria* sp. en este trabajo fue mucho más alto (34,575 %).

Asimismo, la proporción de algunos ácidos grasos no presentaron diferencias significativas entre los géneros estudiados y estaban presentes en muy pequeña proporción (<5%), tales como el ácido palmitoleico (C16:1), heptanodecanoico (C17:0), cis-10-heptadecenoico (C17:1), α -linolénico (18:3 n3), eicosanoico (C20:0) y cis-11,14,17-eicosatrieno (C20:3 n3). También se cuantificó la presencia de otros ácidos grasos que se encuentran en baja proporción como el ácido eicosenoico (C20:1 n9) en donde sólo el valor obtenido para *Undaria* sp. difirió significativamente de las otras dos harinas, y el ácido cis-8,11,14-eicosatrienoico (C20:3 n6) que se encuentra en *Undaria* sp. en una proporción 10 veces mayor que en *Porphyra* sp., mientras que no fue detectado en *Ulva* sp.

Los ácidos grasos insaturados de cadena larga (MUFAs y PUFAs) presentes en mayor proporción en *Undaria* sp. respecto a los otros géneros, además de su mayor contenido lipídico, hacen que esta harina pueda ser empleada como potencial fuente de ácidos grasos esenciales, principalmente ácido oleico. La presencia de estos ácidos grasos no sólo juegan un papel crítico en las propiedades nutricionales sino que también contribuyen con efectos antiinflamatorios, anticancerígenos y podrían prevenir el riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares (Plaza y col., 2008).

4.4 Clorofilas y carotenoides

Los resultados obtenidos para los pigmentos de las harinas de algas estudiadas se muestran en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6: Contenido de pigmentos (base húmeda) de las harinas de algas.

Pigmento	Contenido ($\mu\text{g/g}$) en harina de algas*		
	<i>Undaria sp.</i>	<i>Ulva sp.</i>	<i>Porphyra sp.</i>
Clorofila a	357 ^a (4)	310 ^b (9)	217 ^c (10)
Clorofila b	41 ^b (1)	272 ^a (9)	16 ^c (1)
Clorofilas totales	399 ^b (4)	583 ^a (18)	233 ^c (11)
Carotenoides	123,1 ^a (0,9)	34,0 ^b (0,9)	17,9 ^c (0,6)

*Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según ensayo LSD.

Los errores estándar de las medias se muestran entre paréntesis.

Según los resultados obtenidos, para todos los pigmentos cuantificados el género influyó significativamente, lo que se corresponde con que cada género estudiado pertenece a diferentes clases. *Porphyra sp.*, perteneciente a la clase *Rhodophyta*, fue el que menor contenido de clorofilas totales y carotenoides. Sin embargo, *Ulva sp.*, que pertenece a la clase *Chlorophyta* (algas verdes), fue la que mayor contenido de clorofilas totales alcanzó; de hecho, si bien predominó la clorofila a, la clorofila b representó un gran aporte al total de clorofilas de este género, ya que alcanzó el valor más alto de las tres harinas. Asimismo, mostró bajo contenido de carotenoides, grupo en el cual se podrían encontrar β -carotenos y varias xantofilas características.

Undaria sp. presentó valores elevados de clorofilas totales, en donde predominó la clorofila a por sobre la b, y niveles significativamente más elevados de carotenoides respecto a los otros dos géneros, probablemente por la presencia de fucoxantina (carotenoide predominante en algas pardas).

4.5 Polifenoles totales

Un gran número de moléculas que tienen una estructura fenólica (grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos) han sido identificadas en plantas superiores, los cuales se pueden encontrar en diferentes alimentos, por ejemplo en las frutas (Manach y col., 2005; Denny y col., 2017). Por su parte, las algas también se consideran una buena fuente de polifenoles (Kadam y Prabhasankar, 2010). La presencia de compuestos fenólicos (también conocidos como florotaninos) en algas fue reportada por primera vez por Crato (1893) y posteriormente se demostró que estos compuestos poseen actividades biológicas

importantes tales como propiedades antioxidantes, antiproliferativas, antibióticas, antidiabéticas, antiVIH, antialérgicas y antiinflamatorias (Li y col., 2011).

Los compuestos fenólicos pueden clasificarse en diferentes grupos, en función del número de anillos fenol que poseen y de los elementos estructurales que unen a estos anillos entre sí (Manach y col., 2005). Entre los principales grupos se encuentran los flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos. Además de esta diversidad, los compuestos fenólicos pueden estar asociados con varios carbohidratos y ácidos orgánicos, fibra dietaria, así como entre ellos mismos.

Existen numerosos estudios que comparan la cantidad de polifenoles según el solvente de extracción que se utilice. Por lo general, los trabajos comparan la extracción con agua frente a la extracción con disolventes orgánicos polares, como metanol o etanol. En éste trabajo, el contenido de polifenoles solamente se realizó sobre extractos etanólicos, ya que los extractos acuosos adquirirían un aspecto muy viscoso, probablemente por los hidrocoloides presentes en las harinas, lo cual hacía que los pasos posteriores a la extracción sean sumamente difíciles de realizar. Además, en general, la concentración de polifenoles totales en los extractos acuosos son menores que los que se obtiene con otros solventes de extracción (Farvin y col., 2013; Jiménez y col., 2011; Wang y col., 2009).

En la Tabla 4.7 se presenta el contenido de polifenoles totales obtenidos para las harinas de algas analizadas en este trabajo.

Tabla 4.7: Contenido de polifenoles (base húmeda) en las harinas de algas estudiadas.

Harina de algas	Polifenoles totales* mg ácido gálico / g harina de algas
<i>Undaria</i> sp.	15,50 ^a (0,52)
<i>Ulva</i> sp.	3,19 ^b (0,21)
<i>Porphyra</i> sp.	1,15 ^c (0,05)

*Diferentes superíndices indican que los promedios difieren significativamente ($p < 0,05$) según ensayo LSD. Errores estándar de las medias se muestran entre paréntesis.

El contenido de compuestos fenólicos con potencial actividad antioxidante en algas varía entre especies de algas rojas y pardas (Jiménez-Escrig y col., 2001). Algunos autores han puesto de manifiesto que las algas rojas y verdes tienen menores niveles de compuestos fenólicos que las algas pardas (Jiménez y col., 2011; Kumar y col., 2015). Según los

resultados obtenidos, los contenidos de polifenoles totales confirman lo anterior, ya que los valores obtenidos difieren significativamente entre sí y se observó que la harina de algas con mayor contenido de polifenoles correspondió a *Undaria* sp., seguida por *Porphyra* sp. y *Ulva* sp.

Se ha informado que un grupo de compuestos fenólicos encontrados en algas pardas llamadas florotaninos, que son polímeros de floroglucinol, poseen una fuerte actividad antioxidante y su capacidad de eliminación de radicales libres es más poderosa que la de otros polifenoles derivados de plantas terrestres (Ahn y col., 2007). Además, a pesar de que se ha prestado poca atención a los efectos fisiológicos de los carotenoides en las algas, las fucoxantinas presentes en las algas pardas como *Undaria* sp. recientemente ha atraído mucha atención debido a sus fuertes propiedades antioxidantes que mostraron efectos anticancerígenos, antiobesidad y antiinflamatorios significativos (Miyashita y Hosokawa, 2008).

Dicho esto, como *Undaria* sp. alcanzó el valor más alto de polifenoles, su consumo directo o incorporado en alguna matriz alimentaria podría suponer una ventaja no sólo tecnológica sino también un beneficio nutricional.

4.6 Capacidad antioxidante

Una de las principales propiedades de los compuestos fenólicos es su capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante se puede considerar como la actividad biológica responsable de inhibir la oxidación de biomoléculas importantes promoviendo un efecto preventivo sobre determinadas enfermedades (Soobrattee y col., 2005). Esta actividad de los compuestos fenólicos parece estar relacionada con su capacidad quelante, inhibición de la lipoxigenasa y/o captura de radicales libres (Alamed y col., 2009).

A lo largo de estos últimos años, las fuentes naturales de extractos antioxidantes de algas fueron estudiadas y bien desarrolladas en muchos países (Roohinejad y col., 2016). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos varía en función del grupo de compuestos estudiados y de su solubilidad en diferentes solventes (Freile, 2001). Sin embargo, en general se puede decir que esta propiedad va a depender de la estructura química de los compuestos y de la presencia de grupos hidroxilo presentes en la molécula. Además, la capacidad de ejercer el potencial efecto antioxidante de los compuestos fenólicos va a depender de su bioaccesibilidad en el alimento y su biodisponibilidad en el tracto gastrointestinal (Saura-Calixto, 2010).

Asimismo, como la oxidación en un alimento puede resultar en la producción de olores rancios, cambios de color, flavor indeseables, y reducción del valor nutricional (Jittrepotch, y col., 2006), los compuestos antioxidantes juegan un papel importante como factores protectores frente a la oxidación.

Por otro lado, la determinación de la capacidad antioxidante se ve altamente afectada por el método de análisis, tanto por la etapa de preparación de las muestras y extracción de los antioxidantes, como por el fundamento de la técnica. Por ello, se suele utilizar más de un método a la hora de evaluar la capacidad antioxidante in vitro de un alimento o de un compuesto (Frankel y Meyer, 2000). En este trabajo, se evaluó la capacidad antioxidante sobre extractos etanólicos de las tres harinas de algas utilizando los radicales ABTS^{•+} y DPPH[•]. Los valores obtenidos para cada harina de algas, para ambos ensayos, se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8: Capacidad antioxidante de harinas de algas según ensayos ABTS^{•+} y DPPH[•].

Harina de algas	Capacidad antioxidante (µmoles TROLOX/g harina de algas)*	
	Ensayo de ABTS ^{•+}	Ensayo de DPPH [•]
<i>Undaria</i> sp.	34502 ^a (843)	29417 ^a (287)
<i>Porphyra</i> sp.	1882 ^c (123)	1063 ^c (44)
<i>Ulva</i> sp.	5247 ^b (348)	4238 ^b (99)

*Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según ensayo LSD. El error estándar se muestra entre paréntesis. El resultado se expresó en base húmeda.

Según los resultados obtenidos, se podría decir que las harinas de los tres géneros de algas estudiadas poseen una alta capacidad antioxidante, en el orden *Undaria* sp. >> *Ulva* sp. > *Porphyra* sp. Para ambos ensayos, los géneros difieren significativamente. Asimismo, los valores obtenidos en ambos ensayos son relativamente similares entre sí para cada harina en cuestión.

Las algas marinas pueden presentar en su composición cantidades apreciables de compuestos antioxidantes. Los principales antioxidantes en las algas son los compuestos fenólicos. Seguidamente, se pueden nombrar las vitaminas y los carotenoides, los cuales se pueden encontrar en cantidades significativas en las algas (Pérez-Jiménez y col., 2008).

Muchos investigadores ya han informado de la alta correlación entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante (Athukorala, y col., 2003; Chew y col., 2008;

Rajauria y col., 2010; Siriwardhana, y col., 2003; Wang y col., 2009). Se ha visto que los polifenoles de las algas marinas como los florotaninos, los cuales están presentes en las algas pardas como *Undaria* sp., eliminan los radicales libres, los radicales superóxido (Kuda y col., 2005), el radical peroxilo (Wang y col., 2009), los iones ferrosos quelatados (Chew y col., 2008) y óxido nítrico (Valentão y col., 2010). A su vez, los florotaninos tienen hasta ocho anillos interconectados y, por lo tanto, son antioxidantes más potentes que los polifenoles de las plantas (Wang y col., 2009).

En relación con ello, se encontró una relación estrecha entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de las harinas de algas estudiadas en este trabajo (Figura 4.2 a y b). Una mayor cantidad de polifenoles se tradujo en una mayor capacidad antioxidante. Entre las tres harinas estudiadas, la que se destacó notablemente fue la de *Undaria* sp.

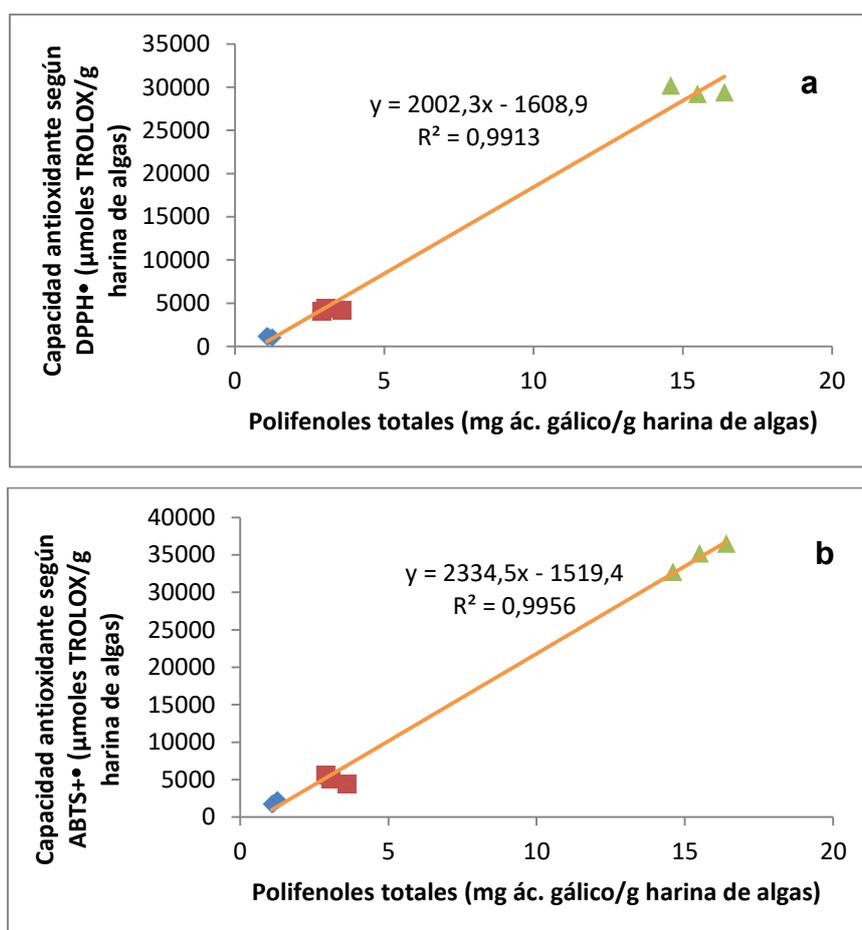


Figura 4.2: Correlación entre capacidad antioxidante evaluada mediante (a) ensayo de DPPH• y (b) ensayo de ABTS•+ y el contenido de polifenoles totales de las harinas de algas. *Porphyra* sp. (◆); *Ulva* sp. (■) y *Undaria* sp. (▲).

Asimismo, en el presente trabajo se observó que la correlación encontrada para la capacidad antioxidante por los dos métodos ensayados y para polifenoles coincide también con la correlación existente entre capacidad antioxidante (por ambos métodos) y el contenido de carotenoides, siendo también *Undaria* > *Ulva* > *Porphyra* (Figura 4.3).

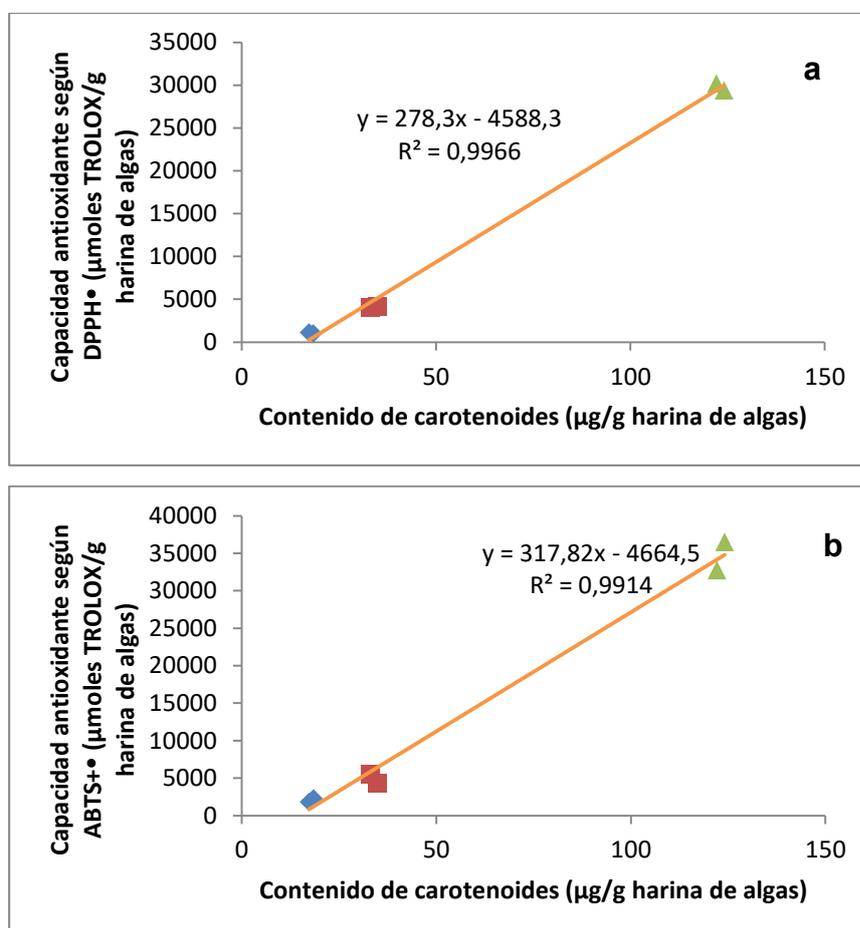


Figura 4.3: Correlación entre capacidad antioxidante evaluada mediante (a) ensayo de DPPH• y (b) ensayo de ABTS•+ y el contenido de carotenoides de las harinas de algas.

Porphyra sp. (◆); *Ulva* sp. (■) y *Undaria* sp. (▲).

4.7 Determinación de parámetros físico-químicos

Las algas marinas contienen diversos compuestos bioactivos con potenciales beneficios para la salud y su uso como ingredientes funcionales abre posibilidades en el procesamiento de alimentos, incluidos los productos cárnicos. Aunque la composición química de algas comestibles varía entre especies, hábitat, madurez y condiciones ambientales, generalmente contienen cantidades útiles de diversos compuestos bioactivos.

Asimismo, las algas marinas suministran diversos ingredientes con aplicaciones tecnológicas (por ejemplo, fibras utilizadas como agentes de textura) que se han utilizado

en el procesamiento de carne. Si bien el contenido de hidrocoloides de las algas está influenciado por numerosos factores biológicos, físicos y medioambientales (Rioux y Turgeon, 2015), la mayoría están localizados en la pared celular. Los más importantes son el agar, alginatos y carragenanos (Roohinejad y col., 2016). Estos hidrocoloides son generalmente utilizados por sus funciones físicas en la estabilización de emulsiones, para gelificar, en suspensiones y espumas, para controlar la viscosidad y controlar el crecimiento de cristales (Chapman, 2012).

Se evaluaron la capacidad de retención de agua (CRA), la capacidad de retención de aceite (CRAc) y grado de hinchamiento (GH) de las diferentes harinas de algas. Los resultados que se muestran en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9: Capacidad de retención de agua (CRA), de aceite (CRAc) y grado de hinchamiento (GH) para las harinas de distintos géneros de algas marinas estudiadas.

Harina de algas	CRA* (g agua/g harina de algas)	CRAc* (g aceite/g harina de algas)	GH* (ml/g harina de algas)
<i>Undaria</i> sp.	6,64 ^a (0,14)	0,99 ^b (0,07)	13,4 ^a (0,3)
<i>Ulva</i> sp.	4,51 ^b (0,07)	1,00 ^b (0,02)	6,9 ^c (0,2)
<i>Porphyra</i> sp.	4,00 ^b (0,80)	1,29 ^a (0,08)	10,9 ^b (1,0)

*Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según ensayo LSD. Los errores estándar de las medias se muestran entre paréntesis.

La capacidad de retención de agua de las algas varía de acuerdo con la especie en cuestión (Suzuki y col., 1996). Según los resultados obtenidos, se pudo observar que la harina correspondiente al género *Undaria* sp. presentó la mayor CRA, con diferencias significativas respecto a las otras dos harinas, las cuales mostraron valores similares. Si bien en este caso la CRA de *Undaria* sp. alcanzó un valor de 6,64 g/g harina de algas en base húmeda (7,22 g/g en base seca), Suzuki y col. (1996) demostraron que la CRA de Wakame (parte correspondiente a la lámina de *Undaria pinnatifida*) era mayor comparada con otras algas, variando entre 19 - 44 g/g peso seco de alga.

Las algas marinas secas pueden hincharse aproximadamente 20 veces su volumen en materia seca cuando se exponen al agua (Kuda y col., 1997). Se pudo observar que *Undaria* sp. presentó el mayor grado de hinchamiento, pudiendo tener relación con la

mayor cantidad de agua que pudo retener en su matriz en comparación con las otras algas.

Las diferencias en la CRA de las algas están estrechamente relacionadas con la cantidad de fibra de la muestra y la composición de polisacáridos de las fracciones de fibra dietaria (Suzuki y col., 1996). Además, también puede depender de otros factores tales como la porosidad, el tamaño de partícula, la fuerza iónica, pH, temperatura, tipo de iones en solución, etc. (Elleuch y col., 2011). Como se puede observar en la Tabla 4.3, el contenido de fibra en las tres harinas varió entre 37 – 46 %, valores considerablemente altos. Si bien en este trabajo no se diferenció la fibra soluble de la insoluble en la cuantificación de la fibra dietaria, Fleury y col. (1991) observaron que las propiedades de afinidad por el agua aumentan conforme el aumento de la solubilidad de la fibra: la fibra soluble en contacto con el agua forma un retículo donde ésta queda atrapada, originando soluciones de gran viscosidad. Si bien *Undaria* sp. fue la harina de algas con menor contenido de fibra dietaria (37,09%) probablemente en su composición posea una mayor cantidad de fibra soluble, lo cual favorecería la capacidad de retención de agua como así también la capacidad de hinchamiento. De hecho, Lahaye (1991) observó que Wakame (lámina de *Undaria pinnatifida*) poseía un 35,3% fibra dietaria total, donde el 30% correspondía a fibra soluble y el 5,3% restante a fibra insoluble. Sin embargo, para Nori (*Porphyra* sp.), la fibra soluble e insoluble se encontraban en una relación 1:1 y para *Ulva latuta* en una relación 1:1,3.

Más allá de las propiedades de hidratación, la fibra posee la capacidad de retener aceite. Según los resultados obtenidos, las tres harinas presentaron bajos valores para CRAc en relación a la CRA, entre 0,99 y 1,29 g aceite / g harina de algas, y únicamente *Porphyra* sp. difirió significativamente de los otros géneros. Fleury y Lahaye (1991) informaron que esto está relacionado con las propiedades superficiales de las partículas pero también con densidad de carga total y con la naturaleza hidrofílica de los constituyentes de las algas, por ej., alginato y fucanos.

PARTE II: Aplicación de las harinas de algas marinas en productos cárnicos

Para definir las formulaciones de hamburguesas de cerdo a estudiar se realizaron ensayos preliminares con el objetivo de establecer cuál/les de las harinas de algas de los distintos géneros era posible utilizar y en qué porcentaje, con el fin de obtener un producto cárnico con sabor aceptable. En una primera instancia, se elaboraron las siguientes formulaciones:

- Hamburguesas adicionadas con harina de *Undaria* sp. al 3%
- Hamburguesas adicionadas con harina de *Porphyra* sp. al 3%
- Hamburguesas adicionadas con harina de *Ulva* sp. al 3%
- Hamburguesas adicionadas con concentrado proteínas de leche al 3% (control)

Una vez cocidas, un grupo reducido de personas probaron una porción de cada hamburguesa y se decidió en conjunto que la formulación que contenía *Undaria* sp. como emulsificante/ligante, era la que mayor aceptación general obtuvo, no sólo en textura, sino también en apariencia, color, olor y principalmente sabor. El fallo en la aceptación de las otras dos formulaciones con harina de algas se debió principalmente a que el gusto era desagradable (para *Porphyra* sp.) y una textura arenosa (para *Ulva* sp.).

Asimismo, según los resultados presentados en la Parte I, la harina de algas del género *Undaria* sp., arrojó mejores resultados en cuanto a polifenoles (sección 4.5), capacidad antioxidante (sección 4.6), así como también en su perfil lipídico (sección 4.3). Por las razones antes mencionadas, la harina de algas del género *Undaria* sp. fue elegida para continuar con la elaboración de las hamburguesas.

En una segunda instancia, se evaluó la incorporación del colorante rojo carmín a fin de mejorar el color, ya que las hamburguesas con *Undaria* sp. presentaban a la vista un color más verdoso respecto al control. Se observó que el colorante mejoraba el color de las hamburguesas con harina de *Undaria* sp., sin embargo, fue contraproducente para la formulación control, ya que el producto resultaba muy rosa. Por esto, se decidió agregar colorante en las hamburguesas con harina de *Undaria* sp., pero no así en el control.

4.8 Parámetros de calidad: Rendimiento, jugosidad y encogimiento de hamburguesas

Se determinó el rendimiento, el encogimiento y la jugosidad para ambas formulaciones para los tiempos: inicial (a los 4 días de ser elaboradas y congeladas), 1, 3, 4, 5 y 6 meses, durante su almacenamiento congelado a -20°C .

Tabla 4.10: Rendimiento en cocción (%) para hamburguesas con proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria* sp. (UND) en función del tiempo de almacenamiento a -20°C .

Formulación	Rendimiento (%)*					
	Inicial	1 mes	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses
MPC	80 ^b (1)	73,2 ^{cd} (0,5)	72 ^d (1)	75 ^c (2)	72,1 ^{cd} (0,7)	75 ^c (1)
UND	85,8 ^a (0,8)	81,5 ^b (0,5)	80,8 ^b (0,6)	82 ^b (1)	80,7 ^b (1,8)	81,3 ^b (0,4)

*Diferentes superíndices indican que los promedios difieren significativamente ($p < 0,05$) según ensayo LSD. Errores estándar de las medias se muestran entre paréntesis.

El **rendimiento** de los productos arrojó valores elevados para ambas formulaciones (72 - 85,8 %, Tabla 4.10). Según el análisis de varianza, el rendimiento se vio afectado por la formulación y el tiempo de almacenamiento. En ambas formulaciones, el mayor rendimiento se obtuvo al tiempo inicial, y si bien al mes disminuyó, luego se mantuvo relativamente estable en el tiempo.

Con respecto a las formulaciones, la hamburguesa con harina de *Undaria* sp. presentó mayores rendimientos a lo largo del almacenamiento a -20°C , respecto a la elaborada con proteínas de leche. Esto puede deberse a que la harina de algas incorporada, por su elevado contenido de fibra, es capaz de retener más agua en el producto. De hecho, *Undaria* sp. alcanzó valores de 37,09 % de fibra dietaria total y fue la harina con mejor capacidad de retención de agua y grado de hinchamiento (sección 4.7). López-López y col. (2010) obtuvieron resultados similares, en donde las formulaciones con bajo contenido de sodio (0,5%) y adicionadas con Wakame (*Undaria pinnatifida*) en un 3,3% poseían una menor pérdida por cocción durante un tiempo corto de almacenamiento, lo cual se tradujo en un mayor rendimiento. Según Cofrades y col. (2008), la mejora en las propiedades de unión puede estar relacionada con los componentes principales de las algas marinas, por ejemplo fibra dietaria (41%) y minerales (36%). Se ha demostrado que estos dos

componentes pueden ser utilizados para superar problemas con las propiedades de unión de agua de productos con bajo contenido de sal en sistemas cárnicos tipo gel o emulsión (Cofrades y col., 2008; López-López, y col., 2009). Asimismo, Selani y col. (2015) demostraron que la adición de subproductos de frutas a hamburguesas reducía la pérdida de peso luego de la cocción, como así también el diámetro y el espesor. Este fenómeno lo han atribuido a que las hamburguesas adicionadas con estos subproductos, que eran ricos en fibra, provocaba efectos positivos en el rendimiento, ya que la fibra posee una buena capacidad de retención de agua (CRA).

Con respecto al **encogimiento**, tanto la formulación como el tiempo de almacenamiento influyeron sobre este parámetro. Los resultados se muestran en la Figura 4.4.

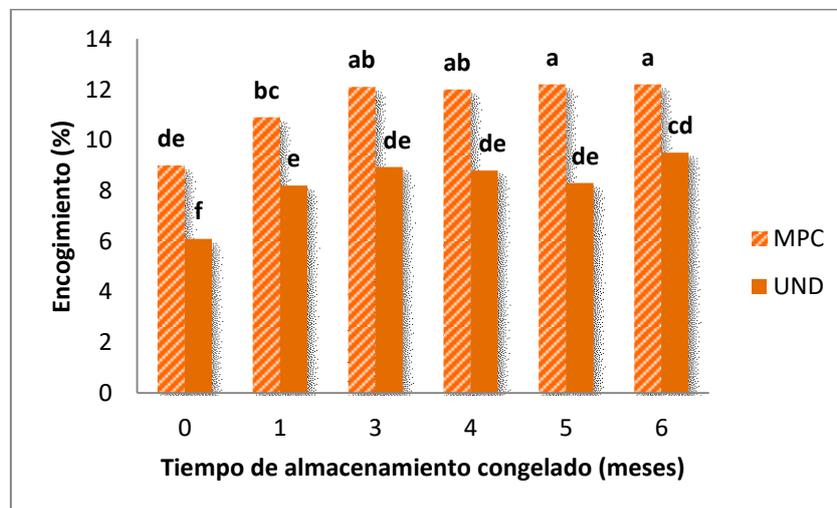


Figura 4.4: Valores medios de encogimiento (%) de hamburguesas: con proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria* sp. (UND) en función del tiempo de almacenamiento a -20°C. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según ensayo LSD.

El cálculo de este parámetro tiene en cuenta los diámetros y espesores de las hamburguesas crudas y cocidas y los relaciona para obtener un valor de cuánto se redujo el tamaño del producto (hamburguesa cocida) luego de la cocción respecto a su tamaño original (hamburguesa cruda). Como se puede observar, el encogimiento fue menor en todos los tiempos en aquellas hamburguesas formuladas con harina de algas con respecto al control. Por otra parte, se puede observar que el encogimiento obtuvo el menor valor en el tiempo inicial para ambas formulaciones y luego aumentó moderadamente durante el almacenamiento. Probablemente esto último esté relacionado con el rendimiento en cocción de las hamburguesas en donde el tiempo, al igual que para el encogimiento,

influyó significativamente, mostrando un comportamiento inversamente proporcional entre estos dos parámetros a lo largo del almacenamiento a -20°C .

La reducción del diámetro de hamburguesas es resultado de la desnaturalización de las proteínas de la carne con la consecuente pérdida de agua y grasa durante la cocción (Besbes y col., 2008). El agregado de harina de *Undaria* sp. a los productos tuvo resultados positivos, ya que las muestras control se encogieron al menos un 3% más para todos los tiempos analizados. Así, la harina de algas del género *Undaria* sp., que presentó elevados contenido de fibra, resultó en efectos deseables, minimizando los cambios de tamaño en este tipo de productos cárnicos procesados como son las hamburguesas.

El alto rendimiento de los productos cocidos resulta importante para asegurar una adecuada **jugosidad**. Los resultados obtenidos para este parámetro se muestran en la Figura 4.5.

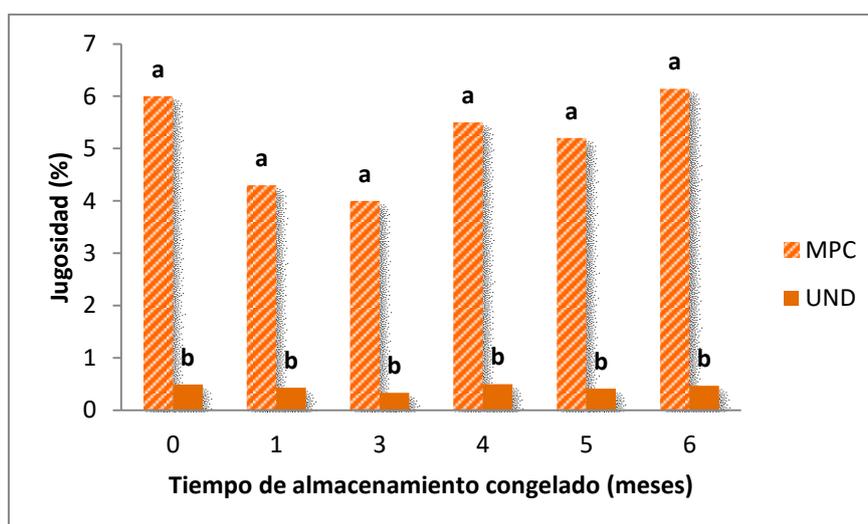


Figura 4.5: Valores medios de jugosidad (%) para hamburguesas con proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria* sp. (UND) en función del tiempo de almacenamiento congelado a -20°C . Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según ensayo LSD.

Según los resultados, el tiempo de almacenamiento no influyó significativamente en la jugosidad de los productos cocidos obtenidos ($p > 0.05$). No obstante, fue evidente que la jugosidad difirió significativamente entre formulaciones, siendo mucho más baja en las hamburguesas en las que se reemplazó el concentrado de proteínas de leche por harina de *Undaria* sp.

En base a estos resultados se pudo comprobar que el empleo de harina de algas en las hamburguesas tuvo efectos positivos, incrementando el rendimiento, y en consecuencia, reteniendo mayor cantidad de agua y lípidos, lo que se evidenció en menor jugo liberado, reduciendo así la pérdida de compuestos importantes del producto.

La migración del agua al exterior de la célula muscular, como puede ocurrir en la congelación, facilita la pérdida de agua del músculo. La cocción también induce la pérdida de agua debido a la retracción del enrejado de los filamentos y la vaina de colágeno endomisial. De acuerdo con Kastner y col. (1980), el picado de la carne durante el proceso de elaboración de las hamburguesas resulta en un producto tierno debido a la rotura de las miofibrillas y del tejido conectivo, lo cual promueve la pérdida de peso durante el proceso de cocción. Este factor resulta en la liberación de fluidos, como agua, nutrientes hidrosolubles, pigmentos y compuestos responsables del aroma y el flavor (Meira, 2013).

En las hamburguesas elaboradas en este trabajo, la grasa fue incorporada en forma de aceite pre-emulsificado, por lo que también podría liberarse durante su almacenamiento congelado o cocción si la emulsión y/o la matriz obtenida lo permiten, evidenciándose por bajos rendimientos, mayor encogimiento y jugosidad.

Las algas presentan en general una alta cantidad de fibra. En algas pardas como *Undaria pinnatifida*, la fracción soluble está constituida principalmente por alginatos, fucanos sulfatados o fucoidanos, mientras que la fracción insoluble es básicamente celulosa (Sanchez-Machado y col., 2004). El elevado contenido de fibra de la harina de *Undaria* sp. (37%, sección 4.3) incorporada en las hamburguesas UND así como su elevada CRA (sección 4.7) afectaron la jugosidad de los productos, reteniendo mayor cantidad de agua en su matriz y liberándola menos durante la compresión, respecto al control ($p < 0,05$). En el mismo sentido, López-López, y col. (2009) reportaron que el agregado de alga (*Sea spaghetti*) a salchichas reducían la jugosidad de las mismas.

4.9 Análisis de Perfil de Textura

Un análisis de perfil de textura (TPA) sobre cilindros de hamburguesas cocidas realizado a diferentes tiempos de almacenamiento permitió evaluar los siguientes parámetros texturales: dureza, adhesividad, cohesividad, elasticidad, masticabilidad y resiliencia.

Los perfiles de textura obtenidos para los productos estudiados, de los cuales se muestra uno a modo de ejemplo en la Figura 4.6, no se observaron picos correspondientes a fracturabilidad. Asimismo, los picos correspondientes a la adhesividad tomaron valores muy pequeños, cercanos a 0, para las dos formulaciones analizadas, variando entre -0,023

y $-0,037$ J para las hamburguesas control (MPC) y entre $-0,005$ y $-0,046$ J para las hamburguesas con harina de *Undaria* sp. (UND) durante todo el tiempo de almacenamiento a -20°C y sólo la formulación tuvo influencia significativa. Para este parámetro, las formulaciones MPC y UND alcanzaron un valor medio de $-0,029$ J (0,002) y $-0,014$ J (0,006) respectivamente.

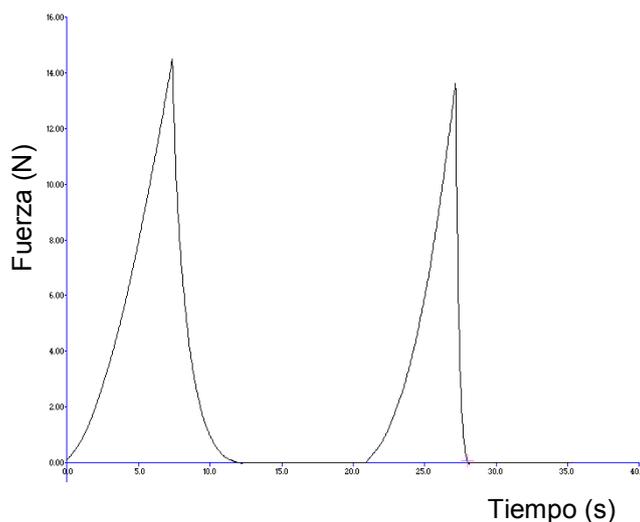


Figura 4.6: Curva típica del análisis de perfil de textura obtenida para las hamburguesas estudiadas en este trabajo.

En la Figura 4.7a y en la Figura 4.7b se muestran los resultados correspondientes a la **dureza** y **masticabilidad** respectivamente, para ambas formulaciones y los diferentes tiempos de almacenamiento congelado a -20°C .

Del análisis de varianza se observó que para para estos dos parámetros el tiempo de almacenamiento, la formulación y la interacción tiempo x formulación influían significativamente.

Dado que la única diferencia entre formulaciones era el reemplazo del concentrado de proteínas de leche por harina de algas, diferentes valores de dureza entre ambas podría atribuirse a la presencia de ésta última. *Undaria* sp. posee en su composición hidrocoloides, que forman parte de la fibra, los cuales podrían incrementar la capacidad de retener agua, haciendo que las hamburguesas adicionadas con la harina de alga alcancen valores de dureza o firmeza mayores que la formulación control. Como la masticabilidad es un parámetro que se calcula como el producto de la dureza x cohesividad x elasticidad, y que en general la cohesividad y elasticidad en módulos son muy pequeñas respecto a la

dureza o no presentan tanta variación (ver más adelante), es de esperar que también la formulación influya sobre este parámetro y tenga un comportamiento similar que la dureza.

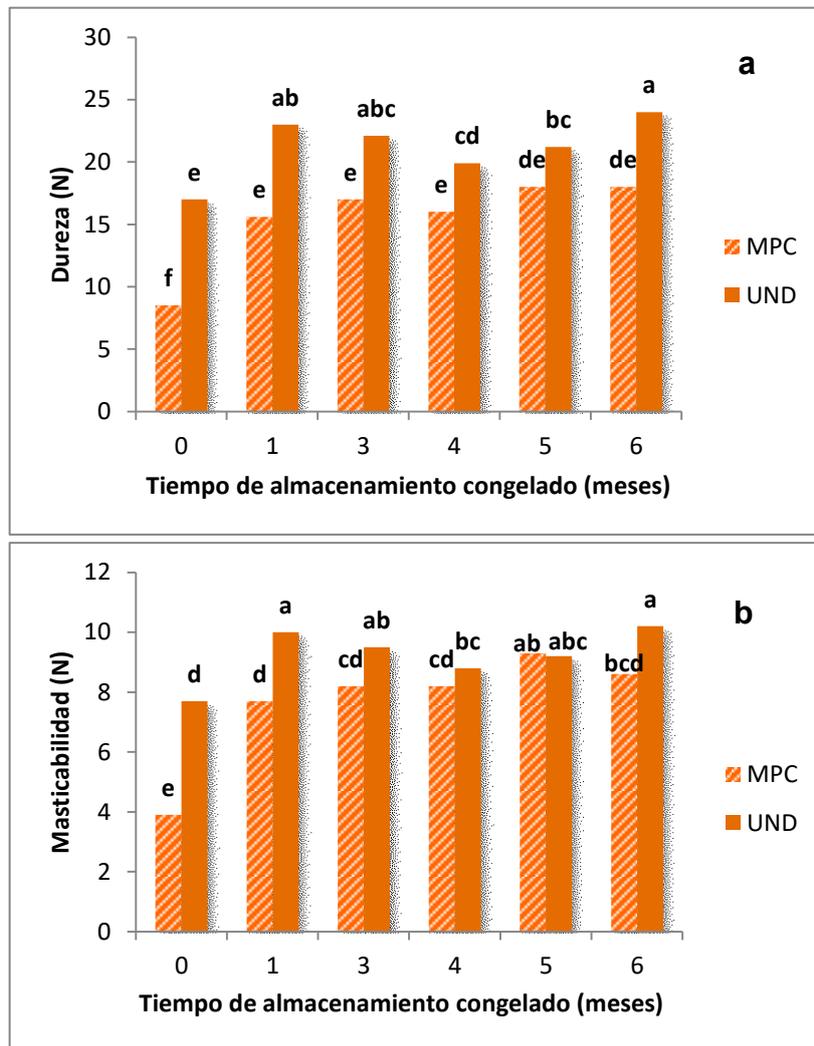


Figura 4.7: Parámetros **(a)** dureza y **(b)** masticabilidad de hamburguesas con concentrado de proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria* sp. (UND) para distintos tiempos de almacenamiento congelado. Letras diferentes indican que los promedios difieren significativamente ($p < 0.05$) según ensayo LSD.

Undaria pinnatifida es una de las especies más abundantes dentro el género *Undaria* sp. y es extensamente consumida en forma de wakame (porción de lámina) y contiene altas concentraciones de fibra dietaria, minerales y también es rica en proteínas (Kunio y Takahisa, 2000; Cofrades y col., 2008). El wakame ha sido incorporado en productos cárnicos tales como hamburguesas (López-López y col., 2010, López-López y col, 2011; Jeon y Choi, 2012). También fue evaluada su incorporación en sistemas cárnicos tipo

gel/emulsión (Cofrades y col., 2008; López-López y col., 2009) para obtener productos bajos en grasas y en sal. El agregado de Wakame a matrices gel/emulsión (2,5 – 5%) favoreció la formación de estructuras más firmes y masticables con mejores propiedades de unión de agua y grasa, ayudando a superar los problemas tecnológicos asociados a los productos bajos en sodio.

Kim y col. (2010), encontraron resultados similares al incorporar 4% de harina de otra variedad de alga parda “*sea tangle*”, perteneciente al género *Laminaria* sp., a salchichas para desayuno, comprobando una reducción en la pérdida de peso e incremento de la estabilidad de la emulsión, favoreciendo una textura con mayor dureza.

Cuando se analizaron la dureza y masticabilidad de las hamburguesas con harina de algas y control en función del almacenamiento congelado, se observó en ambos casos que la menor dureza se alcanzó de manera evidente a tiempo inicial y al primer mes, y que si bien en los meses siguientes hubo una tendencia creciente en el tiempo, se mantuvo razonablemente estable. Esto podría deberse a un leve deterioro de proteínas consecuencia del almacenamiento congelado de las hamburguesas. Se ha encontrado que el almacenamiento congelado causa cambios químicos y estructurales, esencialmente en las proteínas miofibrilares (Awad y col., 1968; Miller y col., 1980), asociados con la formación de estructuras más duras en el producto procesado final (Bhattacharya y col., 1988). Así mismo, la fibra soluble es capaz de ligar agua y formar geles, lo que puede resultar en una mayor resistencia a la masticación. Este efecto fue observado por Selani y col., (2015) cuando estudiaron las propiedades texturales de hamburguesas bajas en grasa adicionadas con subproductos de fruta y aceite de canola, y por Choi y col. (2012) al agregar diferentes niveles de *Laminaria japonica* en hamburguesas de cerdo con bajo contenido graso: la masticabilidad aumentaba de manera proporcional con el aumento de la concentración de esta alga.

En la Figura 4.8a, Figura 4.8b y Figura 4.8c se observan los resultados obtenidos para **elasticidad**, **cohesividad** y **resiliencia** respectivamente, para las dos formulaciones.

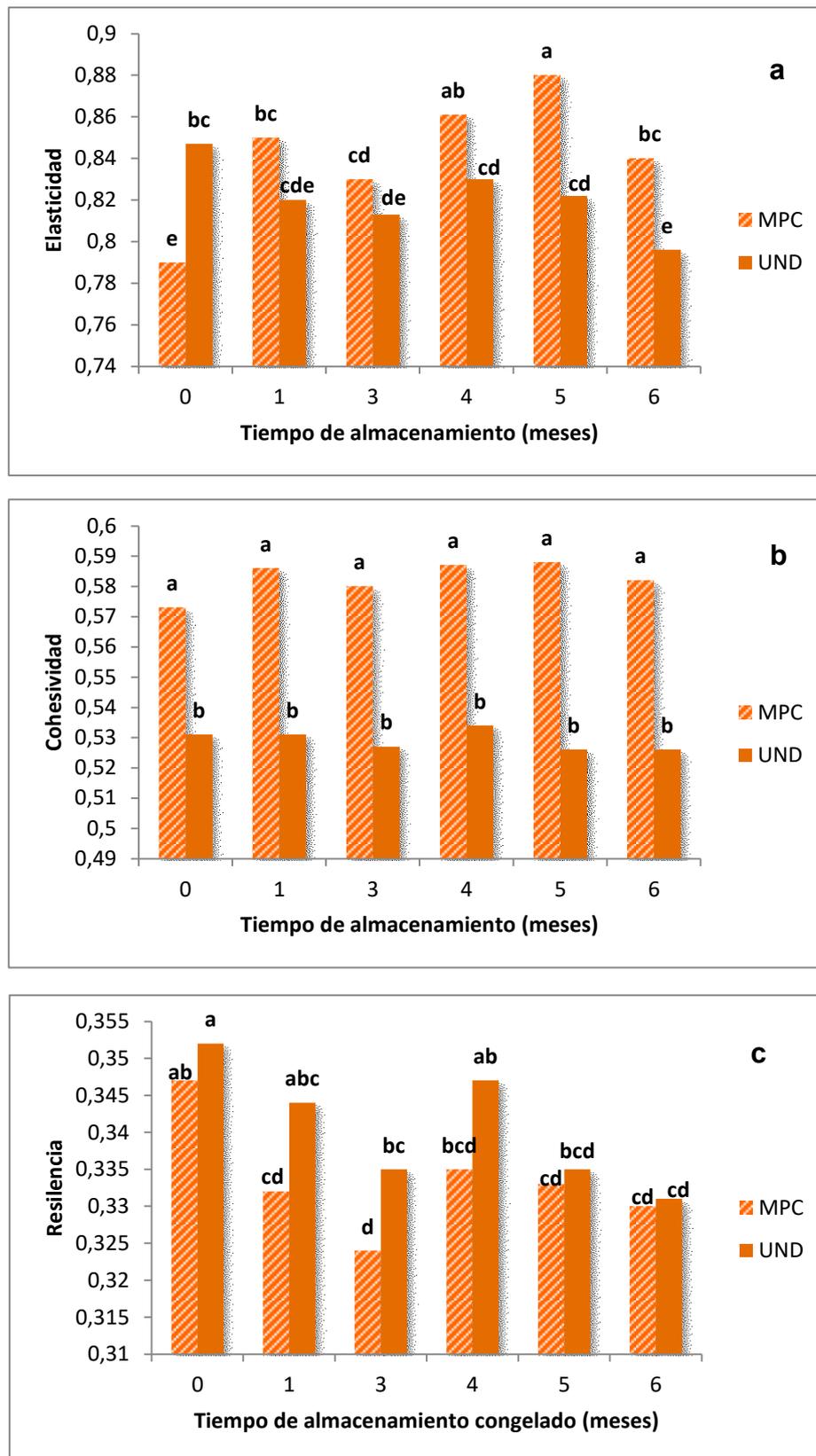


Figura 4.8: Variación de elasticidad (a), cohesividad (b) y resiliencia (c) de hamburguesas con concentrado de proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria* sp. (UND) con el tiempo de almacenamiento congelado. Letras diferentes indican que los promedios difieren significativamente ($p < 0.05$) según ensayo LSD.

El reemplazo del concentrado de proteínas de leche por harina de *Undaria* sp. produjo hamburguesas ligeramente menos elásticas ($p < 0.05$) y el tiempo de almacenamiento influyó significativamente en este parámetro. Los valores de cohesividad variaron entre 0,573 – 0,588 J/J y 0,526 – 0,531 J/J para la formulación MPC y UND respectivamente, siendo significativamente diferentes entre formulaciones pero no con el tiempo de almacenamiento. Youssef y col., (2011) encontraron que los altos valores de cohesividad podrían estar relacionados con una mayor pérdida en cocción, lo que generaría el desarrollo de una matriz proteica más cohesiva. Esto explicaría la mayor cohesividad de las hamburguesas control, ya que el rendimiento en cocción siempre fue menor respecto a las hamburguesas que poseían harina de algas. Con respecto a la resiliencia, se pudo observar que la formulación y el tiempo de almacenamiento tuvieron influencia significativa sobre este parámetro.

4.10 Color

Se evaluó el color de las hamburguesas cocidas para evaluar el efecto del reemplazo de concentrado de proteínas de leche por harina de *Undaria* sp. en la formulación, dado que éste es uno de los principales parámetros que determinan la aceptación del producto por parte del consumidor y sus decisiones de compra.

Pietrasik (1999), informó que en productos reformulados, pueden existir cambios en los parámetros de color en relación con los contenidos de grasa, agua y pigmento de la carne, factores que para ambas formulaciones eran similares (proporciones constantes de carne, aceite de girasol alto oleico, y agua). Sin embargo, se incorporó colorante carmín al producto con harina de algas según ensayos preliminares.

En este trabajo se evaluó el efecto de la formulación y del tiempo de almacenamiento sobre los tres parámetros de color (L^* , a^* y b^*) en productos cocidos. Los resultados se muestran en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11: Parámetros de color medidos en hamburguesas con concentrado de proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria* sp. (UND) en función del tiempo de almacenamiento congelado*.

Formulación	Tiempo (meses)	L*	a*	b*
MPC	0	74,6 ^a (0,3)	4,77 ^{bc} (0,07)	12,7 ^{bc} (0,1)
	1	71,7 ^c (0,2)	5,11 ^a (0,07)	12,5 ^{cd} (0,2)
	3	72,2 ^{bc} (0,2)	4,94 ^{ab} (0,06)	12,3 ^d (0,1)
	4	72,8 ^b (0,3)	4,77 ^{bc} (0,07)	12,7 ^{bc} (0,1)
	5	71,9 ^c (0,3)	5,0 ^{ab} (0,2)	13, ^{3a} (0,1)
	6	74,7 ^a (0,4)	4,5 ^c (0,1)	12,4 ^{cd} (0,1)
UND	0	67,9 ^d (0,3)	2,6 ^e (0,1)	13,0 ^{ab} (0,1)
	1	65,7 ^f (0,2)	2,79 ^e (0,09)	12,5 ^{cd} (0,1)
	3	65,5 ^f (0,2)	2,8 ^e (0,1)	12,3 ^d (0,3)
	4	66,9 ^e (0,3)	2,69 ^e (0,06)	12,71 ^{bc} (0,09)
	5	66,3 ^{ef} (0,3)	2,8 ^e (0,1)	12,5 ^{cd} (0,2)
	6	65,7 ^f (0,3)	3,1 ^d (0,1)	12,6 ^{cd} (0,1)

*Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según ensayo LSD. Los errores estándar de las medias se muestran entre paréntesis.

Según el análisis de varianza, la formulación afectó significativamente a los parámetros L* y a*. El parámetro b*, sin embargo, no se vio afectado ($p > 0,05$) por dicho factor. El tiempo de almacenamiento tuvo efectos significativos sobre los parámetros L* y b* únicamente y la interacción formulación x tiempo fue significativo para los tres parámetros.

Comparado con la hamburguesa control (MPC), la incorporación de harina de *Undaria* sp. provocó una leve disminución de la luminosidad (L*) para todos los tiempos analizados. En un estudio donde se adicionó *L. japonica* en polvo (1, 3 y 5%) a hamburguesas de cerdo reducidas en grasa se reportó el mismo comportamiento (Choi y col., 2012). Esta menor luminosidad en las hamburguesas con harina de algas podría atribuirse a que ésta posee una gran cantidad de pigmentos, tales como carotenoides y clorofilas (sección 4.4). A su vez, el valor de L* alcanzó un máximo a tiempo inicial, y luego tendió a decrecer. Este comportamiento se observó en ambas formulaciones. Esto podría estar asociado a las pérdidas de agua, evidenciadas como menores rendimientos con el tiempo de

almacenamiento congelado, lo que resulta en una mayor concentración de solutos, y un producto más oscuro ($< L^*$).

Para el parámetro a^* , que representa los colores rojo cuando es positivo y verde cuando toma valores negativos, se observó una reducción de casi el 50% con el reemplazo de concentrado de proteínas de leche por harina de *Undaria* sp., a pesar de la incorporación del colorante, pero manteniéndose en valores positivos. Cofrades y col. (2011) demostraron que la inclusión de algas en sistemas de gel/emulsión disminuía el valor del color rojo (a^*).

Para el caso de b^* , que representa los colores de amarillo (+) y azul (-) y, los cuales no son típica o intuitivamente relacionados con carne (Mancini y Hunt, 2005), osciló entre 12 y 13, sin diferencias entre formulaciones.

4.11 Capacidad antioxidante en la matriz cárnica

Como fue mencionado anteriormente, las algas marinas pueden presentar en su composición cantidades apreciables de compuestos antioxidantes. En consecuencia, la adición de algas comestibles a sistemas cárnicos procesados podría causar un incremento en el contenido de polifenoles y en la actividad antioxidante de los mismos

La capacidad antioxidante de los extractos de ambas formulaciones fue determinada por los métodos de DPPH $^{\bullet}$ y ABTS $^{\bullet+}$. Los resultados se exponen en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12: Capacidad antioxidante según ensayos ABTS $^{\bullet+}$ y DPPH $^{\bullet}$ para los extractos de hamburguesas: con concentrado de proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria* sp. (UND).

Formulación	Capacidad antioxidante*	
	(μ moles TROLOX / g de hamburguesa)	
	DPPH $^{\bullet}$	ABTS $^{\bullet+}$
UND	1036 ^a (48)	1884 (3)
MPC	782 ^b (37)	1826 (28)

*Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según ensayo LSD. Los errores estándar de las medias se muestran entre paréntesis.

Hay informes disponibles en los que se han agregado algas marinas como *Enteromorpha*, *Himanthalia elongata*, *U. pinnatifida* y *Porphyra umbilicalis* (2,5% y 5%) a

productos cárnicos (Cofrades y col., 2008; López-López y col., 2009) y productos a base de cereales y se observaron cambios en el potencial antioxidante del producto final (Grupa y Abu-Ghannam, 2011). Según los resultados obtenidos, se pudo observar que para el ensayo de DPPH[•], la formulación con harina de algas del género *Undaria* sp. (UND) presentó capacidad antioxidante significativamente mayor que el control (MPC). Sin embargo, para el ensayo de ABTS^{•+}, la formulación no tuvo efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

El incremento en la capacidad antioxidante de las hamburguesas con harina de *Undaria* sp. podría representar una mejora de la calidad de los productos cárnicos, no sólo desde el punto de vista tecnológico, sino que podría mejorar su estabilidad oxidativa durante el procesamiento y almacenamiento (Lee y col., 2006; Valencia y col., 2007), así como proveer una potencial ventaja nutricional, debido a los beneficios de estos compuestos bioactivos en el estado redox del organismo (Bocanegra y col., 2009), y al impacto de los polifenoles antioxidantes en la salud humana por su posible prevención frente a enfermedades crónicas. Todos estos aspectos requieren de más estudios para evaluar diferentes parámetros, como por ejemplo la biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes en la matriz de cárnica, como así también las actividades biológicas derivadas de su consumo.

4.12 Oxidación lipídica

El seguimiento de la oxidación lipídica se realizó mediante la cuantificación de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS, mg MDA/kg producto) sobre ambas formulaciones de hamburguesas cocidas a los diferentes tiempos de almacenamiento a -20°C. Los resultados se muestran en la Tabla 4.13.

La oxidación de lípidos da lugar a la aparición de olores y sabores desagradables (rancidez oxidativa), lo que provoca una reducción de la vida útil del producto, haciéndolo muchas veces inaceptables por el consumidor (Nawar, 1993).

Tabla 4.13: Oxidación lipídica (N° de TBARS) de hamburguesas con proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria* sp. (UND) cocidas en función del tiempo de almacenamiento congelado.

Formulación	Tiempo (meses)	N° de TBARS* (mg MDA/kg)	Δ TBARS
MPC	0	0,144 ^f (0,032)	0
	1	0,138 ^f (0,010)	-0,006
	3	0,150 ^f (0,002)	0,012
	4	0,166 ^{e^f} (0,005)	0,016
	5	0,179 ^{e^f} (0,011)	0,013
	6	0,202 ^e (0,005)	0,023
UND	0	0,566 ^a (0,024)	0
	1	0,285 ^d (0,004)	-0,281
	3	0,346 ^c (0,029)	-0,220
	4	0,289 ^d (0,007)	-0,277
	5	0,410 ^b (0,004)	-0,156
	6	0,412 ^b (0,004)	-0,154

*Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según ensayo LSD. Los errores estándar de las medias se muestran entre paréntesis.

En esta experiencia, todos los factores analizados, incluido la interacción formulación x tiempo, resultaron significativos. Los valores de TBARS iniciales medidos en ambas formulaciones (MPC y UND) fueron muy diferentes. En el caso de la formulación con harina de *Undaria* sp. el número de TBARS fue más alto respecto al control en todos los tiempos ensayados. Esta diferencia entre los valores de TBARS, podría deberse a la presencia de posibles interferencias, como algunos azúcares, que podrían ser aportados a la formulación por el agregado de la harina de *Undaria* sp., los cuales si bien no son derivados de la oxidación lipídica, pueden generar interferencias coloreadas. Otro factor que podría generar interferencias en la determinación es la temperatura, ya que han demostrado que la reacción entre el TBA y el MDA es más específica a temperatura ambiente que a ebullición (Wang y col., 2002).

A su vez, analizando los ΔTBARS para ambas formulaciones se observó que se mantuvieron relativamente estables o aumentaron muy poco hasta el cuarto - quinto mes

de almacenamiento, aumentando después. Sin embargo, durante los 6 meses de almacenamiento congelado estos valores resultaron inferiores a 0,6 mg MDA/kg producto, valor que se ha establecido como límite mínimo para la detección organoléptica de rancidez (Georgantelis y col., 2007). Los valores encontrados coinciden con estudios de López-López y col. (2010), quienes cuantificaron las TBARS en hamburguesas durante el almacenamiento congelado, con un tiempo de reacción de 20 h a temperatura ambiente, encontrando diferencias de 0,27 y 0,42 mg MDA/kg muestra entre el comienzo y fin del almacenamiento, valores relativamente bajos para productos de estas características.

Por otro lado, también se realizó un seguimiento del n° TBARS para hamburguesas crudas refrigeradas a 4 °C. Los resultados se exponen en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14: Oxidación lipídica (TBARS) de hamburguesas crudas con proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria* sp. (UND) en función del tiempo de almacenamiento a 4°C.

Formulación	Tiempo (días)	N° de TBARS* (mg MDA/kg)	Δ TBARS
MPC	0	0,085 ^c (0,017)	0
	7	0,257 ^b (0,053)	0,172
	10	0,223 ^b (0,076)	0,138
UND	0	0,246 ^b (0,027)	0
	7	0,230 ^b (0,006)	-0,016
	10	0,557 ^a (0,016)	0,311

*Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según ensayo LSD. Los errores estándar se muestran entre paréntesis.

Para las hamburguesas refrigeradas el n° de TBARS se vio afectado por la formulación, el tiempo y la interacción formulación x tiempo. A tiempo inicial, los valores obtenidos fueron bajos, aunque algo mayor para el caso de la formulación UND, y fueron aumentando con el tiempo en ambas formulaciones, siendo este aumento algo mayor para las hamburguesas con harina de *Undaria* sp., efecto que también puede evidenciarse observando las diferencias (Δ TBARS).

En la sección 4.6, se puso en evidencia que *Undaria* sp. fue la harina de algas con mayor capacidad antioxidante y su utilización en productos cárnicos podría resguardarlos

de la oxidación lipídica. Sin embargo, si bien los ensayos para evaluar la capacidad antioxidante in vitro (por ejemplo, el ensayo DPPH[•] y/o ABTS^{•+}) cuantifican la potencial actividad antioxidante in vitro, pueden no predecir con exactitud lo que ocurrirá en sistemas complejos tales como alimentos cárnicos (Moroney y col., 2015). Como se puede observar, los niveles de TBARS detectados en todos los tiempos fueron mayores en el caso de la formulación que contenía *Undaria* sp., posiblemente por la presencia de interferencias mencionadas anteriormente. A su vez, para ambas formulaciones los valores fueron aumentando conforme al tiempo de almacenamiento, tanto en muestras congeladas cocidas como refrigeradas crudas, siendo en este último caso de mayor magnitud. Moroney y col., (2013) reportaron que las sales y minerales presentes en los extractos de algas podrían promover la oxidación lipídica en hamburguesas de cerdo. Asimismo, en carne fresca, la sal puede promover la formación de ferrilmioglobina hipervalente, la cual es un iniciador de la oxidación lipídica (Rhee y Ziprin, 2001).

4.13 Recuentos microbianos

La producción de hamburguesas implica el picado de la carne, con la posibilidad de aumento de la carga microbiana y a veces mucha manipulación. Por lo tanto, la higiene en estos productos es una preocupación para la salud dada su asociación a enfermedades entéricas (Karr y col., 1994).

Las algas y los extractos de las mismas evocaron el interés como una fuente natural de productos con actividad antimicrobiana. Éstas han sido estudiadas por su potencial uso como alternativa para el tratamiento de muchos problemas infecciosos (Abu-Ghannam y col., 2013).

Los resultados obtenidos para el recuento de los diferentes microorganismos se exponen en la Tabla 4.15 para las hamburguesas crudas refrigeradas a 4°C por 10 días y en la Tabla 4.16 para las hamburguesas crudas congeladas durante 1 mes a -20°C.

Tabla 4.15: Recuentos microbianos de hamburguesas con concentrado de proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria* sp. (UND) en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a 4°C.

Microorganismos	Log (UFC/g)*					
	UND			MPC		
	Inicial	7 d	10 d	Inicial	7 d	10 d
Mesófilos totales	5,849 ^e (0,015)	7,336 ^d (0,039)	9,002 ^b (0,002)	5,781 ^f (0,012)	8,476 ^c (0,001)	9,463 ^a (0,003)
Bacterias lácticas	6,027 ^c (0,026)	6,767 ^b (0,004)	7,788 ^a (0,032)	6,017 ^c (0,030)	6,185 ^b ^c (0,469)	7,809 ^a (0,061)
Hongos y Levaduras	5,110 ^d (0,005)	5,643 ^c	6,715 ^b (0,025)	4,927 ^e (0,045)	5,653 ^c	6,947 ^a (0,002)
<i>Enterobacteriaceae</i>	3,809 ^c (0,005)	5,000 ^b	8,632 ^a	3,894 ^c (0,040)	5,204 ^b	8,781 ^a

*Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según ensayo LSD.

Los errores estándar de las medias se muestran entre paréntesis.

Tabla 4.16: Recuentos microbianos de hamburguesas con concentrado de proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria* sp. (UND) al mes de su almacenamiento a -20°C.

Microorganismos	Log (UFC/g)*	
	UND	MPC
Mesófilos totales	5,53 ^b (0,12)	6,09 ^a (0,02)
Bacterias lácticas	5,00 ^b (0,04)	5,30 ^a (0,02)
Hongos y Levaduras	4,09 ^b (0,03)	4,43 ^a (0,04)
<i>Enterobacteriaceae</i>	3,52 (0,04)	3,46 (0,06)

*Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según ensayo LSD.

Los errores estándar de las medias se muestran entre paréntesis.

Para el recuento de los **mesófilos totales** de las hamburguesas refrigeradas, tanto la formulación, como el tiempo de almacenamiento y la interacción formulación x tiempo fueron significativos. Los valores iniciales fueron de 5,781 y 5,849 log (UFC/g) para la formulación UND y MPC respectivamente. Según el Artículo 156 tris del Código Alimentario Argentino, los productos preparados a base de carne picada pueden tener un recuento de

aerobios mesófilos/g entre 4-5 log UFC/g por lo que desde el tiempo inicial el recuento de las dos formulaciones superaron este criterio microbiológico. Esto pudo deberse a diversos factores, como ser la elaboración artesanal, ya que si bien todos los utensilios fueron previamente sanitizados y se tomaron todos los recaudos necesarios, la elaboración implicó mucho tiempo y manipulación a temperatura ambiente, con lo cual probablemente la falta de refrigeración en todo este proceso pudo favorecer la proliferación de estos microorganismos. El agregado de *Undaria* sp. a las hamburguesas no evidenció ningún efecto antimicrobiano, ya que los valores fueron similares para ambas formulaciones durante todo el tiempo de almacenamiento a 4°C y aumentó con los días. Por otra parte, el recuento de dichos microorganismos en hamburguesas congeladas al primer mes de almacenamiento a -20°C mostró una menor carga microbiana en la formulación con harina de *Undaria* sp.

Para las **bacterias lácticas**, los valores obtenidos para las hamburguesas congeladas fueron de 5,00 y 5,30 log (UFC/g) para la formulación UND y MPC respectivamente, los cuales resultaron diferentes entre sí ($p < 0,05$). Por otro lado, para las hamburguesas refrigeradas, los recuentos a tiempo inicial fueron de 1 orden mayor para ambas formulaciones. La diferencia entre los valores obtenidos en función del tipo de almacenamiento podría deberse a que el congelado afecta en algunos casos de forma irreversible a los microorganismos, inhibiendo de por sí el desarrollo microbiano, haciendo que el recuento sea más bajo. Para el almacenamiento a 4°C, la formulación no influyó en el crecimiento de bacterias lácticas pero si el tiempo: en una semana, el recuento de este grupo de microorganismos se mantuvo estable ($p > 0,05$) y recién a los 10 días se observó un aumento marcado en los recuentos.

La familia ***Enterobacteriaceae***, que incluye una gran cantidad de bacterias anaerobias facultativas, es comúnmente utilizada como indicador de buenas condiciones higiénicas. Los valores obtenidos fueron bajos para las dos condiciones de almacenamiento. Tanto la formulación como el tiempo de almacenamiento refrigerado influyeron en los recuentos de este grupo de microorganismos. Con el transcurso del tiempo, el nivel de bacterias aumentó hasta llegar a valores de 8,63 y 8,78 log UFC/g para la formulación UND y MPC respectivamente. Con respecto a la formulación, si bien la diferencia es leve, se puede observar que las hamburguesas que contenían la harina de *Undaria* sp. presentaron recuentos menores que las hamburguesas control ($p < 0,05$). Esta pequeña diferencia puede deberse a que la harina quizás posee algún compuesto que actúe como antimicrobiano frente a esta familia de microorganismos. Kolsi y col., (2015) realizaron

extractos de 13 especies de algas marinas con diferentes solventes y evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos frente a diferentes microorganismos, incluyendo *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella entérica*. Los resultados que obtuvieron demostraron que todos los extractos exhibieron una potente actividad antimicrobiana y ésta era mayor en aquellos extractos obtenidos a partir de algas pardas.

Tanto para las hamburguesas refrigeradas y congeladas, el recuento de **hongos y levaduras** no se vio afectado por la formulación. No obstante, para la condición de almacenamiento a 4°C, el tiempo de almacenamiento influyó sobre los valores obtenidos, en donde se pudo observar un aumento progresivo de estos microorganismos. Frente a estos resultados, se podría decir que el agregado de harina de alga a las hamburguesas no las resguardaría frente a la contaminación con hongos y levaduras. Esto puede deberse a que la harina de *Undaria* sp. no posea actividad antifúngica o, simplemente, que en la concentración en la que está en el alimento no es suficiente para actuar frente a este grupo de microorganismos. En contraste con los resultados obtenidos en este trabajo, existen numerosos autores que demuestran la actividad antifúngica de las algas. Por ejemplo, Kolsi y col., (2015) han demostrado que los extractos de algas que realizaron tenían una actividad antifúngica contra levaduras (*Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*) y hongos (*Aspegillus niger*).

En conclusión, todos los recuentos realizados en ambas formulaciones fueron superiores a los establecidos en los criterios microbiológicos del Código Alimentario Argentino. Los altos recuentos puede tener causas multifactoriales como ser contaminación ambiental, poca eficiencia del procedimiento de elaboración/proceso, condiciones de higiene no óptimas de artefactos y utensilios, relaciones tiempo-temperatura de almacenamiento, etc.

4.14 Características nutricionales - Contenido de lípidos y perfil de ácidos grasos de hamburguesas

Para determinar el contenido lipídico de las dos formulaciones, primero se realizó una estimación del porcentaje de lípidos que tenían las hamburguesas cocidas, teniendo en cuenta la cantidad de lípidos que aportan los ingredientes a la formulación final, como así también el rendimiento (Tabla 4.17).

Tabla 4.17: Estimación del contenido de grasa para ambas formulaciones: con proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria* sp. (UND), crudas y cocidas, teniendo en cuenta el contenido graso de los ingredientes y el rendimiento en cocción.

	Harina de <i>Undaria</i> sp	Nalga de cerdo	Aceite girasol alto oleico	% lípidos en hamburguesa cruda	% lípidos en hamburguesa cocida	% lípidos medidos***
% lípidos	4,81*	2**	99	-	-	-
% en formulación UND	3	75,8	10	11,56	13,47	13,5 (0,2)
% en formulación MPC	0	75,8	10	11,416	14,27	13,4 (0,3)

*Contenido lipídico según Tabla 4.3. ** Contenido de grasa de este corte es el reportado por García (INTA, Castelar) ***Lípidos determinados por método de Soxhlet en hamburguesas cocidas.

Considerando los ingredientes que integraron la formulación de ambas hamburguesas como así también su contenido graso y el rendimiento, se pudo observar que el contenido de lípidos determinados por el método de Soxhlet coinciden con lo esperado (Tabla 4.17), debido a que prácticamente no hubo pérdida de lípidos luego de la cocción, ya que la emulsificación con la harina de *Undaria* sp. y la matriz cárnica resultante fueron adecuadas. Como la formulación de ambas hamburguesas (MPC y UND) se elaboró con nalga de cerdo, corte que se caracteriza por ser magro, y que además ambas formulaciones poseían un 10% de aceite de girasol de alto oleico, es intuitivo pensar que el contenido lipídico de las formulaciones finales se debe principalmente a la suma entre estas dos fuentes lipídicas, razón por la cual no se encontraron diferencias significativas en el contenido de lípidos de ambas formulaciones, siendo el mismo de 13,4 % (0,2). La adición de *Undaria* sp. en la formulación UND en principio no incrementó la cantidad de lípidos en la formulación final. Esto puede deberse a que las algas poseen un bajo contenido de grasa (Cofrades y col., 2008), con lo cual su agregado en una pequeña proporción (3%) no fue suficiente como para modificar este parámetro.

El perfil de ácidos grasos de ambas formulaciones se expone en la Tabla 4.18.

Tabla 4.18: Perfil de ácidos grasos (g AG/100 g) en las hamburguesas con concentrado de proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria sp.* (UND) cocidas.

Ácido graso	Contenido de cada ácido graso (%) en formulaciones*	
	MPC	UND
Ac. Mirístico C14:0	0,32	0,53
Ac. Palmítico C16:0	17,8	14,8
Ac. Palmitoleico C16:1	0,35	0,63
Ac. Esteárico C18:0	8,0	7,6
Ac. Oleico C18:1 cisn9	63,2	68,1
Ac. Linoleico C18:2 cisn6	9,52	7,68
Ac. α -Linolénico C18:3 n3	0,15	0,34
Ac. Eicosanoico C20:0	0,56 ^a	0,37 ^b

* Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según ensayo LSD.

Según los resultados obtenidos, se pudo observar que no hubo diferencias significativas en el perfil lipídico entre las formulaciones, salvo para el caso del ácido eicosanoico, el cual está presente en cantidades levemente superiores en la formulación control. El ácido graso que se encuentra en mayor proporción en ambas formulaciones es el ácido oleico, debido a que tanto para la carne de cerdo, como para el aceite empleado y para la harina de *Undaria sp.* (sección 4.3) es el ácido graso mayoritario, y por ello alcanza más del 65 % en el perfil resultante de los productos.

En vista de la implicancia que tiene el consumo de carne y grasas en la salud humana, se han utilizado diversas estrategias para obtener productos cárnicos más saludables. Una de estas estrategias implica el uso de diferentes ingredientes no cárnicos (de fuentes marinas o vegetales), que le confieren al producto un perfil lipídico particularmente prometedor (López – López y col., 2009). Las algas marinas comestibles se han descritas como fuentes naturales de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (n-3 y n-6 PUFAs) (Bocanegra y col., 2006; Fleurence y col., 1994; Sánchez Machado y col., 2004). Como se explicó anteriormente, el agregado de *Undaria sp.* en hamburguesas de cerdo con aceite de girasol alto oleico resultó en cambios menores en su perfil de ácidos grasos.

Por lo tanto, para indagar un poco más en los efectos del agregado de harina de algas marinas los resultados se agruparon según el tipo de ácido grasos y se calcularon los índices de aterogenicidad y trombogenicidad (Tabla 4.19).

Tabla 4.19: Cantidad de ácidos grasos agrupados según la cantidad y tipo de insaturaciones, índices de aterogenicidad y trombogenicidad para: hamburguesas con concentrado de proteínas de leche (MPC) o con harina de *Undaria* sp. (UND).

	MPC	UND
Σ MUFA	63,46	68,70
n6 PUFA	9,52	7,68
n3 PUFA	0,15	0,34
n6/n3 PUFA*	63,47 ^a	23,04 ^b
Índice de aterogenicidad (IA)	0,261	0,221
Índice de trombogenicidad (IT)	0,707	0,587

* Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según ensayo LSD.

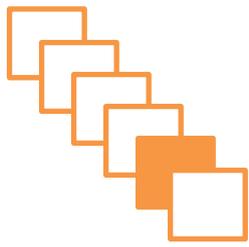
En general, comparando las dos formulaciones, los valores de grupos de Σ MUFA y n-3 PUFA no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, López-López y col., (2009) encontraron que el total de n-3 PUFA eran mayores ($p < 0,05$) en productos cárnicos emulsionados adicionados con 5,6% de Wakame. Eso sugiere que posiblemente el agregado de la harina de algas en una mayor proporción a la formulación, modificaría positivamente el perfil de ácidos grasos, aumentando el porcentaje de n-3 PUFAs.

El balance entre n-6/n-3 PUFA es de gran importancia en relación con enfermedades coronarias (CVD “*coronary heath deseare*”) (Enser, 2000; Okuyama e Ikemoto, 1999). En términos dietarios, para prevenir CVD se recomienda reducir esta relación a un valor menor que 4 (OMS, 2003). La adición de *Undaria* sp. a la formulación provocó diferencias significativas entre las formulaciones para la relación n-6/n-3 PUFA, y la redujo en aproximadamente un 36,3%. Si bien la relación recomendada es < 4 , este descenso provocado por la adición de *Undaria* sp. a la formulación es de importancia nutricional ya que permite el desarrollo de alimentos saludables, reduciendo el riesgo de sufrir diferentes patologías, incluyendo diabetes, cáncer y CVD (Delgado-Pando y col., 2011).

El índice de aterogenicidad (IA) y el índice de trombogenicidad (IT) también se encuentran en la Tabla 4.20. Para ambos índices, la formulación no influyó significativamente ($p>0,05$). No obstante, ambos índices tomaron valores bajos lo cual resulta positivo ya que indicarían una reducción en los riesgos de diferentes enfermedades cardiovasculares (Marchetti y col., 2016).

La cantidad de algas que se pueden utilizar en la formulación de productos saludables dependen de las características de calidad que se buscan en el producto final. Si bien otros autores han utilizado la misma o incluso una mayor cantidad de alga en la formulación de sus alimentos, en la proporción ensayada en este trabajo, el agregado de un mayor porcentaje de *Undaria* sp. probablemente hubiese resultado en un producto que no iba a ser aceptable desde el punto de vista sensorial, al menos para el paladar del consumidor de nuestro país, no acostumbrado a este tipo de sabores y/o productos.

Esto establece una limitación en la posibilidad de mejorar el perfil lipídico de productos cárnicos. Por lo tanto, a pesar de que la adición de harina de algas a las hamburguesas puede ser útil por razones tecnológicas (ya sea por su propiedad de formar geles, capacidad de retención de agua, etc.) y como fuente de compuestos saludables, en las condiciones experimentales ensayadas, la oportunidad de lograr variaciones cuantitativas relevantes en el contenido de lípidos de los productos cárnicos obtenidos a través de la adición de la harina de alga marina está claramente limitada.



5. *Conclusiones*

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación permitió arribar a las siguientes conclusiones

I. Respecto a las harinas de algas marinas

- La actividad acuosa para las tres harinas de algas fue considerablemente baja, lo que garantizaría una estabilidad frente a contaminantes biológicos y a la oxidación lipídica.
- Los tamaños de partícula fueron menores para la harina de *Ulva* sp. Se evidenció con la sonicación una posible aglomeración en el caso de las harinas de *Undaria* sp. y *Porphyra* sp.
- Los componentes analizados para determinar la composición centesimal fueron afectados en todos los casos por el género en cuestión.
- El contenido de humedad para las tres harinas de algas alcanzaron valores por debajo del límite establecido por el Código Alimentario Argentino (15%) siendo apropiados para su preservación por tiempos prolongados.
- El contenido de cenizas de las harinas de algas fueron elevados, con lo cual podrían ser una fuente importante de algunos macro minerales y minerales traza.
- Las tres harinas de algas presentaron bajos contenidos lipídicos (<5%), siendo sus ácidos grasos de entre 14 y 20 carbonos, saturados e insaturados. Dentro de estos últimos, la presencia de algunos ácidos esenciales hace que las harinas de algas puedan ser utilizadas como una buena fuente de PUFAs. De los tres géneros, se destacó *Undaria* sp., principalmente por su contenido de ácido oleico.
- Respecto al contenido de pigmentos se evidenció un mayor contenido de clorofilas en harina de *Ulva* sp. (algas verdes), mientras que los carotenoides resultaron en mayor cantidad en harina de *Undaria* sp. (algas pardas).
- El contenido de polifenoles totales difirió significativamente entre las harinas de los diferentes géneros. *Undaria* sp. fue el género que se destacó frente a *Ulva* sp. y *Porphyra* sp., Asimismo, *Undaria* sp. presentó la mayor capacidad antioxidante seguido por *Ulva* sp. y *Porphyra* sp. para ambos ensayos realizados. Se encontró una elevada correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles así como de carotenoides. Con lo cual el consumo directo de harina de *Undaria* sp o incorporado en alguna matriz alimentaria podría aportar beneficio nutricional además del tecnológico por la capacidad antioxidante asociado a ellos.

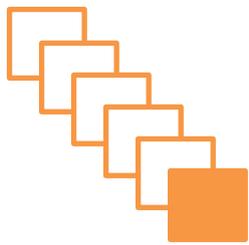
- La capacidad de retención de agua y el grado de hinchamiento fueron mayores para la harina de *Undaria* sp., debido fundamentalmente a la presencia de hidrocoloides capaces de ligar más agua y retenerla en su matriz. La capacidad de retención de aceite fue baja para las tres harinas.

II. Respecto a la inclusión de harina de algas en hamburguesas

- La harina de *Undaria* sp. fue la que en estudios preliminares resultó adecuada para incorporar al producto.
- El agregado de harina de *Undaria* sp. a la formulación en reemplazo de concentrado de proteínas de leche:
 - ✓ Incrementó el rendimiento y redujo el encogimiento y jugo liberado para todos los tiempos analizados.
 - ✓ Modificó los parámetros de textura, resultando en hamburguesas con mayor firmeza, menor elasticidad y cohesividad respecto a la formulación con concentrado de proteínas de leche.
 - ✓ Produjo pequeñas variaciones en las medidas de color, disminuyendo los valores de a^* y L^* , sin afectar al parámetro b^* .
 - ✓ La capacidad antioxidante evaluada con el método del DPPH[•] resultó mayor
 - ✓ Las diferencias en el número de TBARS fueron algo mayores en las hamburguesas adicionadas con *Undaria* sp., aumentado aún más a partir del 5to mes de almacenamiento.
 - ✓ No se evidenció ningún efecto antimicrobiano tanto en hamburguesas crudas refrigeradas ni congeladas.
- El contenido lipídico para ambos productos, hamburguesas con harina de *Undaria* sp. o con concentrado de proteínas de leche, fue de 13,4%, y se correspondió con lo esperado, en donde se tuvieron en cuenta la composición de los ingredientes, la proporción de cada uno y el rendimiento, lo que puso en evidencia que la emulsificación con la harina de *Undaria* sp. y la matriz cárnica resultante fue adecuada. El perfil lipídico no se vio afectado por la adición de la harina de algas, sin embargo disminuyó la relación n-6/n-3, haciéndolas más adecuadas a las recomendaciones nutricionales.

La caracterización química y nutricional de las harinas de algas marinas del Mar Argentino puso en evidencia que su utilización en alimentos podría traer ventajas tanto

nutricionales como tecnológicas. El agregado de la harina de *Undaria* sp. permitió el desarrollo de productos cárnicos tipo hamburguesas, con aceite pre-emulsificado y con menor contenido de sodio respecto a los de consumo cotidiano, con buenas características fisicoquímicas y mayor capacidad antioxidante.



6. *Bibliografia*

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Ghannam, N., Rajauria, G., Domínguez, H. (2013). Antimicrobial activity of compounds isolated from algae. *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals* (pp. 287–306). Woodhead Sawston.
- Agregán, R., Munekata, P.E., Domínguez R., Carballo, J., Franco D., Lorenzo, J.M. (2016). Proximate composition, phenolic content and in vitro antioxidant activity of aqueous extracts of the seaweeds *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Fucus vesiculosus*. Effect of addition of the extracts on the oxidative stability of canola oil under accelerated storage conditions. *Food Research International*
- Ahn, G.N., Kim, K.N., Cha, S.H., Song, C.B., Lee, J., Heo, M.S., Jeon, Y.J. (2007). Antioxidant activities of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H₂O₂-mediated DNA damage. *European Food Research and Technology*, 226(1–2), 71–79.
- Alamed J., Chaiyasit, W., McClements, D.J., Decker, E.A. (2009). Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(7):2969-2976.
- Álvarez, D., Xiong, Y., Castillo, M., Payne, F., Garrido, M. (2012). Textural and viscoelastic properties of pork frankfurters containing canola–olive oils, rice bran, and walnut. *Meat Science*, 92(1), 8-15.
- Análisis microbiológico de los alimentos: Metodología analítica oficial. Microorganismos indicadores (2014). ANMAT Vol. III. p 14
- Anandh, M.A., Lakshmanan, V., Anjaneluyy, A. (2003). Designer meat foods. *Indian Food Industry*, 22, 40–45.
- Andrés, S.C., Zaritzky, N.E., Califano, A.N. (2009). Innovations in the Development of healthier chicken sausages formulated with different lipid sources. *Poultry Science*, 88, 1755-1764.
- Andrés, S., Zaritzky, N. y Califano, A. (2006). The effect of whey protein concentrates and hydrocolloids on the texture and colour characteristics of chicken sausages. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 954–961.
- Andrés, S.C., Pennisi Forell, S.C., Ranalli, N., Zaritzky, N.E. y Califano, A.N. (2011). “Healthier functional beef burgers”. En *Agricultural Research Updates – Volume 2*. ISBN: 978-1-61470-191-0. Nova Science Publishers, Inc.

- Angell, A.R., Mata, L., de Nys, R., Paul, N.A. (2015). The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. En: *Journal of Applied Phycology*.
- Annunziata, A. y Vecchio, R. (2011). Functional foods development in the Europeanmarket: A consumer perspective. *Journal of Functional Foods*, 3(3), 223–228.
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis* (14th). Washington, DC. Association Official Analytical Chemists. 1141. pp.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, (15th). Total dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method. Arlington, VA: The Association.
- Apostolidis, E., Kwon, Y-I., Shetty, K. (2008). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 317–324.
- Argentina Investiga (2014). Fideos con algas patagónicas: una innovación culinaria bien del sur. Disponible en: http://argentinainvestiga.edu.ar/noticia.php?titulo=fideos_con_algas_patagonicas_una_innovacion_culinaria_bien_del_sur&id=2152
- Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219–229.
- Asensi, A (1981). Programas de investigación sobre el recurso de las algas marinas bentónicas en el litoral patagónico. UNESCO.
- Awad, A., Powrie, W.D., Fennema, O. (1968). Chemical deterioration of frozen bovine muscle at 4°C. *Journal of Food Science*, 33, 227–235.
- Ayo J., Carballo J., Serrano J., Olmedilla-Alonso B., Ruiz-Capillas C., Jiménez-Colmenero F. (2007). Effect of total replacement of pork back fat with walnut on the nutritional profile of frankfurters. *Meat Science* 77:173 – 181
- Barbut, S. (2006). Effects of caseinate, whey and milk powders on the texture and microstructure of emulsified chicken meat batters, *LWT - Food Science and Technology*, 39(6), 660–664.
- Barrow, C. y Shahidi, F. (2008). *Marine nutraceuticals and functional foods*. Nueva York: CRC Press.
- Beecher, G.R. (1999). Phytonutrients' role in metabolism: Effects on resistance to degenerative processes. *Nutrition Reviews*, 57(9), S3–S6.

- Besbes, S., Attia, H., Deroanne, C., Makni, S., Blecker, C. (2008). Partial replacement of meat by pea fiber and wheat fiber: Effect on chemical composition, cooking characteristics and sensory properties of beef burgers. *Journal of Food Quality*, 31(4), 480–489.
- Best, D. (1991). Whatever happened to fiber. *Prepared Foods*, 160, 54–58.
- Beuchat, L.R. (1981). Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Foods World* 26, 345-349.
- Bhattacharya, M., Hanna, M.A., Mandigo, R.W. (1988). Effect of frozen storage conditions on yields, shear-strength and color of ground-beef patties. *Journal of Food Science*, 53(3), 696–700.
- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedi, J., Ródenas, S., Sánchez-Muniz, F. J. (2009). Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *Journal of Medicinal Food*, 12, 236–258.
- Bocanegra, A., Benedi, J., Sanchez-Muniz, F. (2006). Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo- and hypercholesterolaemic growing rats. *British Journal of Nutrition*, 95, 696–702.
- Boraso, A. L., Rico, A. E., Perales, S., Pérez, L., Salazar H. (2003). *Algas Marinas de la Patagonia. Una guía ilustrada. 1ª ed.-Buenos Aires: Fundación de Historia Natural Félix de Azara. ISBN 950-99787-7-9*
- Brading, J.W.E., Georg-Plant, M.M.T., Hardy, D.M. (1954). The polysaccharide from the alga *Ulva lactuca*: purification, hydrolysis, and methylation of the polysaccharide. *J. Chem. Soc.*, 319–324.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25-30.
- Brijesh, K.T., Declan, J.T. (2015). Seaweed sustainability – food and non food applications. En: *Seaweed sustainability. Food and non-food applications*. Ed. Tiwari B K y Troy D J. Elsevier.
- Burtin, P. (2003). Nutritional value of seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2, 498–503.
- CAA. Código Alimentario Argentino. ANMAT, Capítulo VI. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_VI_2018.pdf
- CAA. Código Alimentario Argentino. ANMAT, Capítulo XI. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_XI.pdf
- Chapman, V. (2012). *Seaweeds and their uses*. Springer Science & Business Media.

- Chen, C.H., Pearson, A.M., Gray, J.I. (1992). Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry*, 3, 177–183.
- Chen, J. H., Lim, J. D., Sohn, E. H., Choi, Y. S., Han, E. T. (2009). Growth-inhibitory effect of a fucoidan from brown seaweed *Undaria pinnatifida* on Plasmodium parasites. *Parasitology Research*, 104, 245–250.
- Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M., Khoo, K. S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *Lebensmitten Wiss Technology*, 41, 1067–1072.
- Choe E. y Oh S. (2013). Effect of water activity on the lipid oxidation and antioxidants of dried laver (*Porphyra*) during storage in the dark. *Journal of Food Science*, 78, 8, 1144-1151.
- Choi, Y.S., Choi, J.H., Han, D.J., Kim, H.Y., Kim, H.W., Lee, M.A., Chung, H.J, Kim, C.J. (2012) Effects of *Laminaria japonica* on the physico-chemical and sensory characteristics of reduced-fat pork patties. *Meat Science* 9, 1–7
- Chojnacka, K., Saeid, A., Witkowska, Z., Tuhy, L. (2012). Biologically active compounds in seaweed extracts - the prospects for the application. *The Open Conference Proceedings Journal*, 3, 20-28.
- Cofrades, S., Benedí, J., Garcimartin, A., Sánchez-Muniz, F.J., Jiménez-Colmenero F. (2016). A comprehensive approach to formulation of seaweed-enriched meat products: From technological development to assessment of healthy properties. *Food Research International*.
- Cofrades, S., Guerra, M.A., Carballo, J., Fernández-Martín, F., Jiménez-Colmenero, F. (2000). Plasma protein and soy fiber content effect on bologna sausage properties as influenced by fat level. *Journal of Food Science*, 65(2), 281–287.
- Cofrades, S., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Jiménez-Colmenero, F. (2011). Quality characteristics of low-salt restructured poultry with microbial transglutaminase and seaweed. *Meat Science*, 87(4), 373–380.
- Cofrades, S., López-López, I., Solas, M.T., Bravo, L., Jiménez-Colmenero F. (2008). Influence of different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low-salt gel/emulsion meat systems. *Meat Science* 79, 767-776
- Cofrades, S., Serdarolu, M., Jiménez-Colmenero, F. (2013). Design of healthier foods and beverages containing whole algae.

- Cox, S., Abu-Ghannam, N., Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal*, 17, 205–220.
- Dawczynski, C., Schubert, R., Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fiber in edible seaweed products. *Food Chemistry*. 103, 891–899.
- de Jesus Raposo, M.F., deMorais, A.M., deMorais, R.M. (2015). Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine Drugs*, 13, 2967–3028.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Rodríguez-Salas, L., Jiménez-Colmenero F. (2011) A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté. *Meat Science*. 88, 241-248
- Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O. (2002). Other natural pigments. *Natural Colorants for Food Nutraceutical Uses*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Determination of food carbohydrates/D.A.T. Southgate. - London: Applied Science Publishers, 1976. p.108.
- Ellekjaer, M.R., Naes, T., Baardseth, P. (1996), Milk Proteins Affect Yield and Sensory Quality of Cooked Sausages. *Journal of Food Science*, 61: 660–666.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124(2), 411-421.
- El-Magoli S., Laroia S., Hansen P.M.T. (1996). Flavor and Texture Characteristics of Low Fat Ground Beef Patties Formulated with Whey Protein Concentrate. *Meat Science* 42: 179-193. p 182-183
- Enrique, C. y Lester, P. (2002). *Handbook of antioxidants*. New York: Marcel Dekker.
- Enser, M. (2000). Producing meat for healthy eating. In *Proceedings of the 46th international congress of meat science and technology* (Vol. I, pp. 124–129). Buenos Aires, 27 Agosto –1 Septiembre.
- FAO (2002). *Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo*. Roma. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/004/y3550s/Y3550S05.htm>
- FAO (2003). *A guide to the seaweed industry*. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e00.htm#Contents>
- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma. 224 pp.
- Farvin, K.H.S., Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry* 138 1670-1681

- Fenemma, O.R. (1996), Química de los Alimentos, 3a Edición. Ed. Acribia.
- Fernández-Ginés, J.M., Fernández-López, J., Sayas-Barbera, E., Pérez-Álvarez, J.A. (2005). Meat products as functional foods: A review. *Journal of Food Science*, 70, R37–R43.
- Fleurence J. (1999). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci Technol*. 10:25–38.
- Fleurence, J., Gutbier, G., Mabeau, S., Leray, C. (1994). Fatty-acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast. *Journal of Applied Phycology*, 6, 527–532.
- Fleury, N. y Lahaye, M. (1991). Chemical and physico-chemical characterisation of fibres from *Lamiaria digitata* (Kombu Breton): physiological approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55, 389–400.
- Foegeding, E. A., Lanier, T. C. y Hultin, H.O., (1996). Características de los tejidos musculares comestibles. En *Food Chemistry*. Ed. Fennema, O.R. Marcel Dekker, Nueva York.
- Frankel, E.N., Meyer, A.S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.
- Freile, Y. (2001). “Algas en la botica”. *Avance y Perspectiva*. v.20, p:283-291.
- Fung, A., Hamid, N., Lu, J. (2013). Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chemistry*. 136 1055-1062
- Gago Cabezas L., Garcia Iglesias E., Andrés J.B. (2009). Informe de Vigilancia Tecnológica sobre optimización de la presencia de compuestos funcionales en carne de bovino mediante estrategias basadas en la alimentación. Circulo de Innovacion en Biotecnología –cibt-, Informe de Vigilancia Tecnológica realizado para fedecarne.
- García, P.T. “Contenido de grasa total y colesterol de los distintos cortes del cerdo” (INTA, Castelar). Disponible en: <https://www1.hospitalitaliano.org.ar/#!/home/aprender/noticia/5764>
- Gómez Ordoñez, E. (2013). Tesis doctoral. Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles. Estudios in vitro e in vivo. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- Gómez-Ordoñez, E., Jiménez-Escrig, A., Rupérez, P. (2010). Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Research International*, 43, 2289-2294.

- Graham, L., Wilcox, L., 2000. Algae. Prentice Hall Inc., Upper Saddle River, NJ.
- Gudiel-Urbano, M., Goñi, I. (2002). Effect of edible seaweeds (*Undaria pinnatifida* and *Porphyra tenera*) on the metabolic activities of intestinal microflora in rats. Nutrition Research: 22 323-331
- Gupta, S. y Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. Innovative Food Science and Emerging Technologies 12, 600-609
- Gupta, S., Cox, S., Abu-Ghannam, N. (2011). Effect of different drying temperatures on the moisture and phytochemical constituents of edible Irish brown seaweed. LWT - Food Science and Technology 44, 1266-1272.
- Hamid, N., Ma, Q., Boulom, S., Liu, T., Zheng, Z., Balbas, J., Robertson, J. (2015). Seaweed minor constituents. En: Seaweed sustainability. Food and non-food applications. Ed. Tiwari B K y Troy D J. Elsevier.
- Hasperu  J. H., Lemoine L., Vicente A.R., Chaves A., Martínez G. A. (2015). Postharvest senescence of florets from primary and secondary broccoli inflorescences. Postharvest Biology and Technology 104: 42–47
- Harnedy, P.A., FitzGerald, R.J., 2011. Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae. J. Phycol. 47, 218–232.
- Haugan, J.A., Liaaen-Jensen, S.V. (1994). Algal carotenoids. Carotenoids of brown algae (phaeophyceae). Biochem. Syst. Ecol. 22 (1), 31–41.
- Hermansson, A.M. y  kesson, C. (1975). Functional Properties of Added Proteins Correlated With Properties Of Meat. Effect of Concentration and Temperature on Water-Binding Properties of Model Meat Systems. Journal of Food Science, 40: 595–602.
- Holdt, S.L., y Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. Journal of Applied Phycology, 23(3), 543-597.
- Ikeda, K., Kitamura, A., Machida, H., Watanabe, M., Negishi, H., Hiraoka, J., & Nakano, T. (2003). Effect of *Undaria pinnatifida* (Wakame) on the development of cerebrovascular diseases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 30, 44–48.
- Imeson, A. P. (2009). Carrageenan and furcellaran. En: G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), Handbook of Hydrocolloids (2da edición) (pp. 164-185). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Jeon, M.R. y Choi, S.H. (2012). Quality characteristics of pork patties added with seaweed powder' Korean J. Food Sci. Anim. Resour. , 32, 77–83.

- Jiménez-Colmenero, F. (1996). Technologies for developing low-fat meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 7(2), 41–48.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science & Technology*, 18(11), 567–578.
- Jiménez-Colmenero, F. (2013). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 52(1), 64-74.
- Jiménez-Colmenero, F., Ayo, M. J., Carballo, J. (2005). Properties of low sodium frankfurter with added walnut: Effect of transglutaminase combined with caseinate, KCl and dietary fibre as salt replacers. *Meat Science*, 69(4), 781–788.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: Their role as functional foods. *Meat Science*, 59, 5–13.
- Jiménez-Colmenero, F., Reig, M., Toldrá, F. (2006). New approaches for the development of functional meat products. En: *Advanced technologies for meat processing* (pp. 275–308). Boca Raton: CRC Taylor y Francis.
- Jiménez-Escrig B., Sanchez-Muñiz, F. J. (2000). Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutrition Research* 20: 585-598.
- Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Pulido, R., Saura-Calixto, F. (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the science of food and agriculture*, 81(5), 530-534.
- Jittrepotch, N., Ushio, H., Ohshima, T. (2006). Oxidative stabilities of triacylglycerol and phospholipid fractions of cooked Japanese sardine meat during low temperatura storage. *Food Chemistry*, 99(2), 360–367.
- Kadam, S. U., Álvarez C., Tiwari, B. K., O'Donnell C. P. (2015). Prossesing of seaweeds En: *Seaweed sustainability. Food and non-food applications*. Ed. Tiwari B K y Troy D J. Elsevier. p 66
- Kaferstein, F. K., Clugston, G. A. (1995). Human health problems related to meat production and consumption. *Fleischwirtschaft*, 75, 889–892.
- Karr, K.J., Marezki, A.N., Knabel, S.J. (1994). Meat and poultry companies assess Usdas hazard analysis and critical control point system. *Food Technology*, 48(2), 117–122.
- Kastner, C.L. y Felício, P.E. (1980) Tratamentos que influem na maciez da carne bovina no período pós abate. *Boletim Técnico – Centro de Tecnologia de Carnes*, 5: 31-64.

- Keeton J.T. (1994). Low-fat meat products-technological problems with processing. *Meat Science*, 36, 261-276.
- Khotimchenko, S.V. (2003). The fatty acid composition of glycolipids of marine macrophytes. *Russian J. Mar. Biol.* 29 (2), 126–128.
- Kim, H.W., Choi, J.H., Choi, Y.S., Han, D.J., Kim, H.Y., Lee, M.A., Kim, S.Y., Kim, C.J. (2010). Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) powder on quality characteristics of breakfast sausages. *Korean J. Food Sci. Anim. Res.* , 30 , 55–61
- Kim, S.K., Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. *J. Func. Foods* 2, 1–9.
- Kloareg, B., Quatrano, R.S., (1988). Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Ocean. Mar. Biol.* 26, 259–315.
- Kolsi, R. B. A., Frikha, D., Jribi, I., Hamza, A., Fekih, L., Belgith, K. (2015). Screening of antibacterial and antifungal activity in marine macroalgae and magnoliophytea from the coast of Tunisia. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 47–51.
- Kuda T., Yokoyama M., Fujii T. (1997) Effects of marine algal diets hijiki, ao Nori, and Nori on levels of serum lipid and cecal microflora in rats. *Fish Sci*; 63:428-32.
- Kumar, S., Sahoo, D., Levine, I. (2015). Assessment of nutritional value in a brown seaweed *Sargassum wightii* and their seasonal variations. *Algal Research*, 9, 117-125.
- Kunio, S., Takahisa, N. (2000). Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(9), 450-454.
- Lahaye M. (1991) Marine algae as sources of fibres. Determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some sea vegetables. *J Sci Food Agric*; 54~587-94.
- Lahaye, M., y Rochas, C. (1991). Chemical structure and physico-chemical properties of agar. *Hydrobiologia*, 221, 137-148.
- Lee, S., Hernández, P., Djordjevic, D., Faraji, H., Hollender, R., Faustman, C., (2006). Effect of antioxidants and cooking on stability of n-3 fatty acids in fortified meat products. *Journal of Food Science*, 71, C233–C238.
- Li, Y.X., Wijesekara, I., Li, Y., Kim, S.K., 2011. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochem.* 46 (12), 2219–2224.
- Lichtenthaler (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. P 366

- Liu, M.N., Huffman, D. L., Egbert, W. R. (1991). Replacement of beef fat with partially hydrogenated plant oil in lean ground beef patties. *Journal of Food Science*, 56(3), 861–862.
- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517S–520S.
- López-López I., Cofrades, S., Yakan, A., Solas, M. T., Jiménez-Colmenero, F. (2010). Frozen storage characteristics of low-salt and low-fat beef patties as affected by Wakame addition and replacing pork backfat with olive oil-in-water emulsion. *Food Research International* 43, 1244–1254
- López-López, I., Bastida, S., Ruiz-Capillas, C., Bravo, L., Larrea, M.T., Sánchez-Muñiz, F., Cofrades, S., Jiménez-Colmenero, F. (2009). Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Science* 83, 492–498
- López-López, I., Cofrades, S., Canenque, V., Díaz, M.T., López, O., Jiménez Colmenero, F. (2011). Effect of cooking on the chemical composition of low-salt, low-fat Wakame/olive oil added beef patties with special reference to fatty acid content. *Meat Science*, 89, 27–34.
- Lordan, S., Ross R.P., Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine drugs* ISSN 1660-3397
- Mabeau, S., Fleurence, J. (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 4(4), 103-107.
- Manach C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert y C. Rémésy. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81(1):230-242.
- Mancini, S., Preziuso, G., Dal Bosco, A., Roscini, V., Szendrő, Z., Fratini, F., Paci, G. (2015). Effect of turmeric powder (*Curcuma longa*L.) and ascorbic acid on physical characteristics and oxidative status of fresh and stored rabbit burgers. *Meat Science*. (110) 93-100.
- Marchetti, L, Andrés, S.C., Califano, A.N. (2016). Physicochemical, microbiological, and oxidative changes during refrigerated storage of n-3 pufa enriched cooked meat sausages with partial NaCl substitution *Journal of Food Processing and Preservation*. DOI: 10.1111/jfpp.12920

- Marquez, E. J., Ahmed, E. M., West, R. L., & Johnson, D. D. (1989). Emulsion stability and sensory quality of beef frankfurters produced at different fat and peanut oil levels. *Journal of Food Science*, 54(4), 867–870, 873.
- McHugh, D. J. (2003). A guide to the seaweed industry: FAO fisheries technical paper no. 441. Roma: FAO.
- Meira, D.P. (2013) Produto tipo hambúrguer formulado com carne bovina e mandioca. 2013. 42p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina,
- Meschino, J.P., (2007). Essential fatty acids and eicosanoids. *Dynam. Chiropr.* 25 (25), 110–115.
- Miller, A. J., Ackerman, S. A., Palumbo, S. A. (1980). Effects of frozen storage on functionality of meat for processing. *Journal of Food Science*, 45(6), 1466–1471.
- MINISTERIO DE SALUD (2011). Menos sal más vida. <http://www.msal.gob.ar/ent/index.php/informacion-para-ciudadanos/menos-sal--vida>
- Mohamed, S., Hashim, S.N., Rahman, H.A. (2012). Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science and Technology*, 23(2), 83-96.
- Mori, K., Ooi, T., Hiraoka, M., Oka, N., Hamada, H., Tamura, M., Kusumi, T., (2004). Fucoxanthin and its metabolites in edible brown algae cultivated in deep seawater. *Mar. Drugs* 2 (2), 63–72.
- Moroney, N.C., O’Grady M.N., O’Doherty, J.V., Kerry, J.P. (2013). Effect of a brown seaweed (*Laminaria digitata*) extract containing laminarin and fucoidan on the quality and shelf-life of fresh and cooked minced pork patties. *Meat Science* 94: 304-311.
- Moroney, N.C., O’Grady, M. N., Lordan S., Stanton, C., Kerry J. P. (2015). Seaweed Polysaccharides (Laminarin and Fucoidan) as Functional Ingredients in Pork Meat: An Evaluation of Anti-Oxidative Potential, Thermal Stability and bioaccessibility. *Marine drugs*, 13, 2447-2464.
- Muchenje, V., Dzama, K., Chimonyo, M., Strydom, P.E., Hugo, A., Raats, J.G. (2009). Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. *Food Chemistry* Vol.112 No.2 pp.279-289.
- Mulvihill, D. M. (1992). Production, functional properties and utilization of milk protein products, in *Advanced Dairy Chemistry. I. Proteins* (P. F. Fox, ed.), Elsevier Applied Science, London, pp. 369-404.

- Murano, E. (1995). Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology*, 7, 245-254.
- Murata, M., y Nakazoe, J. (2001). Production and use of marine algae in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 35(4), 281-290.
- Muse, J. O., Tudino M. B., d'Huicque L., Troccoli, O. E., Carducci, C. N. (1995). A survey of some trace elements in seaweeds from Patagonia, Argentina. *Environmental Pollution*: 87 249-253
- Muzzio, B. (2017). Trabajo Final de Grado. Geles cárnicos emulsionados magros de contenido de sodio reducido con nanocelulosa bacteriana. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.
- Nawar W.W. (1993). Lípidos. En: química de los alimentos 2da edición. Editado por OR fennema, Editorial Acriba, Zaragoza, España.
- Nisizawa, K. (2006). Seaweeds Kaiso, bountiful harvest from the seas. In A. T. Critchley, M. Ohno, & D. B. Largo (Eds.), *World seaweed resources* (pp. 1–86). The Netherland: ETI Bioinformatics. Universidad de Amsterdam.
- Okuyama, H. y Ikemoto, A. (1999). Needs to modify the fatty acid composition of meats for human health. In *Proceedings of the 45th international congress meat science and technology* (Vol. II, pp. 638–640). Yokohama, Japan, 1–6 August.
- OMS (2003) *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases*. Technical report series 916. Geneva: World Health Organization.
- OMS (2016). Reducir el consumo de sal. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs393/es/>
- Palasí Mascaros, J. C. (2015). Trabajo Final de Grado. Caracterización físico – química y nutricional de algas en polvo empleadas como ingrediente alimentario. Escuela Técnica superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universidad Politécnica de Valencia.
- Pangestuti, R. y Kim, S.K. (2011). Biological activities and health benefit effects natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods*, 3, 255-266.
- Pangestuti, R., Kim S-K. (2015) Seaweed proteins, peptides, and amino acids. En: *Seaweed sustainability. Food and non-food applications*. Ed. Tiwari B K y Troy D J. Elsevier.
- Park, J., Rhee, K.S., Keeton, J.T., Rhee, K.C. (1989). Properties of low-fat frankfurters containing monounsaturated and omega-3 polyunsaturated oils. *Journal of Food Science*, 54(3), 500–504.

- Peat, S., Whelan, W.J., Lawley, H.G. (1958). The structure of laminarin.. The main polymeric linkage. *J. Chem. Soc.*, 724–728.
- Peinado, I., Girón, J., Koutsidis, G., Ames, J. M. (2014). Chemical composition, antioxidant activity and sensory evaluation of five different species of brown edible seaweeds. *Food Research International*, 66, 36-44.
- Peng, Y., Hu, J., Yang, B., Lin, X-P., Zhou, X-F., Yang, X-W., Liu, Y. (2015). Chemical composition of seaweeds. En: *Seaweed sustainability. Food and non-food applications*. Ed. Tiwari B K y Troy D J. Elsevier.
- Pennisi Forell, S. C., Ranalli, N., Zaritzky, N. E., Andrés, S.C., Califano, A.C. (2010). Effect of type of emulsifiers and antioxidants on oxidative stability, colour and fatty acids profile of low-fat burgers enriched with unsaturated fatty acids and phytosterols. *Meat Science* 86 (2), 364-370.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41, 274-285.
- Pietrasik, Z. (1999). Effect of content of protein, fat and modified starch on binding textural characteristics, and colour of comminuted scalded sausages. *Meat Science*, 51(1), 17–25.
- Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2008) In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*, 19: 31-39.
- Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT—Food Science and Technology*, 40, 1–11.
- Potty VH. Physico-chemical aspects, physiological functions, nutritional importance, technological significance of dietary fibres. A critical appraisal. *J Food Sci Tech* 1996; 33: 1-8.
- Rajauria, G., Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam, N., Gupta, S. (2010). Effect of hydrothermal processing on colour, antioxidant and free radical scavenging capacities of edible Irish brown seaweeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 2485–2493.
- Ranalli, N. (2009). Trabajo final de Grado. Desarrollo y caracterización de medallones de carne magros enriquecidos con ácidos grasos poli-insaturados y fitoesteroles. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.

- Rasmussen, R. S., Morrissey, M. T. (2007). Marine biotechnology for production of food ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research*, 52, 237–292.
- Rhee, K. y Ziprin, Y. (2001). Pro-oxidative effects of NaCl in microbial growth controlled and uncontrolled beef and chicken. *Meat Science*, 57, 105–112.
- Rioux L.E y Turgeon S.L. (2015). Seaweed carbohydrates. En: *Seaweed sustainability. Food and non-food applications*. Ed. Tiwari B K y Troy D J. Elsevier.
- Rioux L-E., Beaulieu L., Turgeon, S.E. (2017). Seaweeds: a traditional ingredients for new gastronomic sensation. *Food Hydrocolloids*.
- Rioux, L.-E., Turgeon, S.L., Beaulieu, M., 2010. Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicuris*. *Phytochemistry* 71, 1586–1595.
- Roohinejad, S., Koubaa, M., Barba, F. J., Saljoughian, S., Amid, M., Greiner, R. (2016) Application of seaweeds to develop new food products with enhanced shelf-life, quality and health-related beneficial properties. *Food Research International*.
- Rupérez, P. (2002). Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*, 79(1), 23-26.
- Rupérez, P., & Saura-Calixto, F. (2001). Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. *European Food Research and Technology*, 212(3), 349-354.
- Sánchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., López-Hernandez, J., Paseiro-Losada, P. (2004). Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry*, 85, 439-444.
- Saura-Calixto F. (2010). Dietary Fiber as a Carrier of Dietary Antioxidants: An Essential Physiological Function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(1):43-49.
- Selani, M.M., Margiotta, G.B., De S. Piedade, S.M., Contreras- Castillo, C.J., Canniatti-Brazaca, S.G. (2015) Physicochemical, Sensory and Cooking Properties of Low Fat Beef Burgers with Addition of Fruit Byproducts and Canola Oil. 5th International Conference on Biomedical Engineering and Technology (ICBET 2015) Singapur.
- Selani, M.M., Shirado, G.A.N., Margiotta, G.B., Saldaña, E., Spada, F.P., Piedade, S.M. S., Contreras-Castillo, C.J., Canniti-Brazaca, S.G. (2016). Effects of pineapple byproduct and canola oil as fat replacers on physicochemical and sensory qualities of low-fat beef Burger. *Meat Science* 112, 69–76
- Selgas, M. D., Cáceres, E., & García, M. L. (2005). Long-chain soluble dietary fibre as functional ingredient in cooked meat sausages. *Food Science and Technology International*, 11(1), 41–47.

- Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 674-688.
- Siriwardhana, N., Lee, K.W., Kim, S.H., Ha, J.W., Jeon, Y.J. (2003). Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. *Food Science and Technology International*, 9, 339–346.
- Soobrattee, M., Neergheen, V., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O, Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 579(1-2):200-213.
- Stanley, N. F. (2006). Agars. In A. M. Stephen, G. O. Phillips y P. A. Williams (Eds.), *Food Polysaccharides and Their Applications* (Second ed., pp. 217-238). Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Group.
- Suetsuna, K., Maekawa, K., Chen, J.R., 2004. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem.* 15, 267–272.
- Suzuki, T., Ohsugi, Y., Yoshie, Y., Shirai, T., Hirano, T. (1996) Dietary Fiber Content, Water-holding Capacity and Binding Capacity of Seaweeds. *Fisheries Science* 62(3), 454-461.
- Taskin, E., Ozturk, M., Taskin, E., Kurt, O. (2007). Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African Journal of Biotechnology*, 6, 2746–2751.
- Thebaudin, J.Y., Lefebvre, A.C., Harrington, M., Bourgeois, C.M. (1997). Dietary fibres: Nutritional and technological interest. *Trends in Food Science and Technology*, 8(2), 41–48.
- Torres Gonzalez J.D., Gonzalez Morelos K.J., Acebedo Correa D. (2015) Análisis del perfil de textura en frutas, productos cárnicos y quesos - ReCiTeIA. Cali – Valle – Colombia. p 68-69
- Valentão, P., Trindade, P., Gomes, D., de Pinho, P. G., Mouga, T., & Andrade, P. B. (2010). *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: Chemistry and antioxidant potential *Food Chemistry*, 119(4), 1359–1368.
- Wang, B., Pace, R.D., Dessai, A.P., Bovell-Benjamin, A., Phillips B. (2002). Modified Extraction Method for Determining 2-Thiobarbituric Acid Values in Meat with Increased Specificity and Simplicity. *Food Chemistry and Toxicology*. Vol 67 (8) 2833-2836

-
- Wang, T., Jonsdottir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240–248.
 - Wirth, F. (1991). Reducing the fat and sodium content of meat products. What possibilities are there? *Fleischwirtsch*, 71(29), 4–297.
 - Xiong, Y.L. (1994), Myofibrillar protein from different muscle fiber types: Implications of biochemical and functional properties in meat processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* Vol. 34, Iss. 3, 293-320.
 - Ye H., Zhou C., Sun Y., Zhang X., Liu J., Hu Q., Zeng X. (2009). Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from Brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Eur Food Res Technol* 230: 101-109. p 102-103.
 - Youssef, M.K., Barbut, S. (2011). Fat reduction in comminuted meat products—Effects of beef fat, regular and pre-emulsified canola oil. *Meat Science*, 87(4), 356–360.
 - Yuan, Y.V. (2007). Marine algal constituents. In C. Barrow y F. Shahidi (Eds.). *Marine nutraceuticals and functional foods* (pp. 259-296). Boca Raton, FL, 1111 USA: CRC Press
 - Zhou, L., Nilsson, Å. (2001). Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J. Lipid Res.* 42, 1521–1542.
 - Zorrilla, S.E., Rovedo, C.O., Singh, R.P. (2000). A new approach to correlate textural and cooking parameters with operating conditions during double-sided cooking of meat patties. *Journal of texture Studies*, 31: 499-523