



TESIS DOCTORAL

**EFFECTOS DE LA INGESTA DE TETRASELMIS
CHUII SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN
DEPORTISTAS**

Autor:

F.º Javier Rodrigo Bellido

Director:

Marcos Maynar Mariño

**Departamento de Fisiología
2017**

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL DEPORTE**

Departamento de Fisiología



EFFECTOS DE LA INGESTA DE TETRASELMIS CHUII SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN DEPORTISTAS

Memoria que presenta F^º **Javier Rodrigo Bellido** para optar al grado
de *Doctor por la Universidad de Extremadura*.

Cáceres, a 5 de Mayo de 2017



El Dr. D. Marcos Maynar Mariño del Departamento de Fisiología del Ejercicio de la Universidad de Extremadura.

CERTIFICA:

Que D. F ° Javier Rodrigo Bellido, DIPLOMADO EN FISIOTERAPIA, por la Universidad de Cádiz, ha realizado la tesis Doctoral “**Efectos de la ingesta de *Tetraselmis chuii* sobre el estrés oxidativo en deportistas**“ bajo mi dirección y que, a mi juicio, reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en:

Cáceres, a 5 de Mayo de 2017.

Dr. D. Marcos Maynar Mariño.

“A mis hijos Yago y Gala. A mi compañera de viaje Sara, por el apoyo incondicional y cederme vuestro tiempo paterno para poder llevar a término este proyecto.

A mis padres por los valores enseñados y poder conseguir mis objetivos con constancia y humildad”.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento al Departamento de Fisiología y, muy especialmente, a mi director de tesis, Marcos Maynar Mariño. Por los conocimientos, las aportaciones, el tiempo invertido en mi formación y desarrollo de este proyecto, gracias.

Agradecer a todos los miembros del Laboratorio de Fisiología del Ejercicio Paco, Mario, Chule, Julio, Isra, Conchi... por su apoyo incondicional.

Gracias a Carlos Unamunzaga y todo su equipo.

A Diego María Moreno por sus gestiones y apoyo.

Gracias a los deportistas que prestaron su colaboración como sujetos experimentales de esta tesis.

Gracias a esas personas que ocupan un lugar especial en mi vida, quienes me estiman y estimo, por la amistad y los buenos momentos vividos.

Gracias a mis compañeras fisioterapeutas Sonia, Nazareth y Gloria por su esfuerzo y cubrir mis ausencias.

INDICE

ÍNDICE

ÍNDICE.....	12
ÍNDICE DE TABLAS	15
ÍNDICE DE FIGURAS	18
ABREVIATURAS	20
RESUMEN	25
JUSTIFICACIÓN	29
1. INTRODUCCIÓN	35
1.1 ESTRÉS OXIDATIVO Y EJERCICIO FÍSICO	37
1.1.1. Radicales libres: concepto, tipos y fuentes de producción.....	37
1.1.2. Estrés oxidativo	41
1.1.3. Sistemas antioxidantes.....	48
1.1.3.1. Vitamina E.....	51
1.1.3.2. Vitamina A.....	54
1.1.3.3. Vitamina C	56
1.1.4. Actividad física, estrés oxidativo y respuesta anitoxidante.....	59
1.2. MICROALGAS.....	67
1.2.1. Fitoplancton, origen de la vida.....	67
1.2.2. Composición bioquímica de microalgas	69
1.2.3. Pigmentos procedentes de microalgas	72
1.2.4. Microalgas en alimentación animal	75
1.2.5. Microalgas y contaminación del medio acuático	79
1.2.6. Microalgas y péptidos bioactivos.....	81
1.2.6.1. Biopéptidos antioxidantes	81
1.2.6.2. Biopéptidos anticancer.....	83
1.2.6.3. Biopéptidos antihipertención.....	84
1.2.6.4. Biopéptidos antiaterosclerosis	84
1.2.6.5. Biopéptidos inmunomoduladores.....	85
1.3. MICROALGA TETRASELMIS CHUII	86
1.3.1. Análisis de composición	87
1.3.2. Descripción del proceso de producción.....	90
2. OBJETIVOS	95
3. MATERIAL Y METODOS.....	97
3.1. REACTIVOS UTILIZADOS.....	97
3.2. MATERIAL UTILIZADO	99

3.3. SUJETOS DE ESTUDIO	102
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL	103
3.5. PROTOCOLOS DE VALORACIÓN.....	108
3.5.1. Valoración de la composición corporal	108
3.5.2. Protocolo de esfuerzo	110
3.5.3. Protocolo de determinación de umbrales	112
3.5.4. Adquisición y tratamiento de las muestras sanguíneas.....	114
3.5.5. Valoración cardiorrespiratoria	114
3.5.6. Valoración del hemograma	115
3.5.7. Valoración del metabolismo energético	115
3.5.8. Valoración del estrés oxidativo y respuesta antioxidante	115
3.5.9. Valoración de los ácidos grasos eritrocitarios.....	116
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	118
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	120
4.1. VALORACIÓN DEL RENDIMIENTO FÍSICO	120
4.1.1. Valoración antropométrica	120
4.1.2. Análisis del estudio ergoespirométrico	121
4.2. VALORACIÓN SANGUÍNEA.....	126
4.2.1. Hemograma	126
4.2.2. Bioquímica general	128
4.3. Análisis de estrés oxidativo y respuesta.....	129
4.3.1. Valoración de ácidos grasos en eritrocitos	129
4.3.2. Valoración de la respuesta antioxidante no enzimática.....	131
4.3.2.1. Vitamina A y E.....	131
5. CONCLUSIONES	135
6. BIBLIOGRAFÍA	137
ANEXOS	
ANEXO I. Informe de Bioética y Bioseguridad del proyecto	165
ANEXO II. Modelo de consentimiento informado.....	166

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Principales microalgas comercializadas para la alimentación humana	32
TABLA 2. Localización y acciones de las principales vitaminas antioxidantes	50
TABLA 3. Perfil bioquímico de las cepas marinas destinadas a acuicultura con mayor contenido proteínico y lipídico	78
TABLA 4. Resultados del análisis de composición de tres lotes del liofilizado de Tetraselmis chuii procedente de la producción industrial de la empresa Fitoplacton Marino S.L.....	87
TABLA 5. Aminograma (% de proteínas). Resultados del análisis de composición de tres lotes del liofilizado de Tetraselmis chuii procedente de la producción industrial de la empresa Fitoplacton Marino S.L.	88
TABLA 6. Minerales (mg/g). Resultados del análisis de composición de tres lotes del liofilizado de Tetraselmis chuii procedente de la producción industrial de la empresa Fitoplacton Marino S.L.	89
TABLA 7. Ácidos grasos (% de grasa). Resultados del análisis de composición de tres lotes del liofilizado de Tetraselmis chuii procedente de la producción industrial de la empresa Fitoplacton Marino S.L.	89
TABLA 8. % del perfil de A.G. TetraSOD®	92
TABLA 9. SOD TetraSOD®	92
TABLA 10. Vitaminas de TetraSOD®	93
TABLA 11. Reactivos genéricos utilizados.....	97
TABLA 12. Reactivos utilizados en la valoración del estrés oxidativo	97
TABLA 13. Reactivos utilizados en la determinación de la respuesta antioxidante.....	98
TABLA 14. Reactivos utilizados para la valoración de los ácidos grasos	98
TABLA 15. Material utilizado en la valoración médica y la valoración del rendimiento	99
TABLA 16. Material utilizado en la valoración antropométrica	99
TABLA 17. Material genérico utilizado	100
TABLA 18. Material utilizado en la recogida y tratamiento de las muestras	101
TABLA 19. Material utilizado en el análisis de las muestras	101
TABLA 20. Material utilizado para la valoración de los ácidos grasos.....	102
TABLA 21. Valores Antropométricos en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio	120

TABLA 22. Valores ergoespirométricos encontrados en el umbral aeróbico en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio	122
TABLA 23. Valores ergoespirométricos encontrados en el umbral anaeróbico en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio	123
TABLA 24. Valores ergoespirométricos encontrados al final de la prueba en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio	124
TABLA 25. Valores ergoespirométricos encontrados tras tres minutos de recuperación, en reposo, en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio	125
TABLA 26. Hemograma completo en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio	126
TABLA 27. Evolución de algunos parámetros bioquímicos plasmáticos en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio	128
TABLA 28. Porcentaje de ácidos grasos encontrados en la membrana de los eritrocitos de los deportistas del grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio	130
TABLA 29. Valores hallados para los índices de peroxidación lipídica en los eritrocitos en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio....	131
TABLA 30. Valores de Vitaminas A y E ($\mu\text{g/ml}$) en eritrocitos del grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio	131
TABLA 31. Valores de Vitaminas A y E ($\mu\text{g/ml}$) en plasma del grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio.....	132

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Composición del estrés oxidativo y métodos utilizados para su evaluación	46
FIGURA 2. Estructura del α - tocoferol	51
FIGURA 3. Transformaciones del ascorbato	59
FIGURA 4. Representación ideal del modelo trifásico de Skinner y McLellan	113

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Ac: Ácido.

ACSM: Colegio americano de medicina del deporte.

ACTH: Adrenocorticotropa.

AG: Ácido graso.

AGL: Ácido graso libre.

ALA: Ácido α - linolénico.

CAT: Catalasa.

CR: Cociente respiratorio.

DHA: Ácido docosahexaenoico.

DHEA: Dehidroepiandrosterona.

DHEAS: sulfato de dehidroepiandrosterona.

EDTA: Etilenodiamino tetracetato.

EPA: Ácido eicosapentaenoico.

Eq CO₂: Equivalente de dióxido de carbono.

Eq O₂: Equivalente de oxígeno.

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

FC: Frecuencia cardiaca.

FR- Frecuencia respiratoria.

GGT: Gama Glutamil Transpeptidasa

GOT: Glutamato-oxalacetato transaminasa.

GPT: Glutamato piruvato transaminasa.

GPX: Glutación peroxidasa.

GSH: Glutation reducido.

GSSG: glutación oxidado.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

Hb: Hemoglobina.

HC: Hidratos de carbono.

HDL: lipoproteínas de alta densidad.

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión.

Htc: Hematocrito.

IR: Índice de recuperación.

Kcal: Kilocalorías.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

LO: radical alcoxilo.

LOO: radical peroxilo.

MB: Metabolismo basal.

MDA: Malondealdehido.

mL: mililitros.

mmHg: milímetros de mercurio.

ms: milisegundos.

MVV: Máxima ventilación voluntaria.

NEFA: Ácidos grasos no esterificados.

NO: Óxido nítrico.

NS: Variaciones no significativas.

¹O₂: Oxígeno singlete.

O₂⁻: Anión superóxido.

O₂: Oxígeno.

OH[·]: Radical hidróxilo.

ORAC: capacidad de absorción de radicales de oxígeno.

PC: Fosofocreatina.

PEF: Pico de flujo espiratorio.

Peso musc.: Peso muscular.

PG: prostaglandinas.

ppm: pulsaciones por minuto.

PUFA: Ácido graso poliinsaturado.

Pulso O₂: Pulso de oxígeno.

Q: Gasto cardíaco.

REC: Recuperación.

ROO[·] : Radical peróxido.

ROOH[·] : Hidroperóxido.

Sig: Significación.

SOD: Superóxido dismutasa.

TAD: Tensión arterial diastólica.

TAS: Tensión arterial sistólica.

TBA: Ácido tiobarbitúrico.

TBARS: Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico.

UAN: Umbral anaeróbico.

VA: Ventilación alveolar.

VCO₂: Producción de dióxido de carbono.

VE: Ventilación pulmonar máxima.

Vit A: Vitamina A (retinol).

Vit C: Vitamina C (ácido ascórbico).

Vit E: Vitamina E (α- tocoferol, γ- tocoferol, δ- tocoferol).

VO₂ máx: Consumo máximo de oxígeno.

VO₂: Consumo de oxígeno.

XO: Xantina oxidasa.

RESUMEN

RESUMEN

En la literatura actual existen evidentes discrepancias sobre la presencia de estrés oxidativo asociado a diferentes esfuerzos, como sobre los fenómenos adaptativos que podrían resultar si este desequilibrio persiste durante un periodo determinado.

La investigación en nutrición y suplementación en el deporte, tiene un papel importante sobre las mejoras fisiológicas antioxidantes tras la ingesta de determinados alimentos, productos sintéticos, naturales y dietas varias.

Nuestro grupo de investigación, entiende, que la clave de la evolución está en el origen, es por ello, que la búsqueda de nuevos alimentos naturales para ser estudiados nos llevó al lugar donde hace millones de años tuvo origen la vida, el mar, y más en concreto en las microalgas. El fitoplancton marino, microalgas, se encuentra en la base de la cadena alimentaria y de los ecosistemas acuáticos, ya que sirve de alimento a organismos mayores; es decir realiza la parte principal de la producción primaria en los ambientes acuáticos, sobre todos los animales marinos.

A raíz de la revisión bibliográfica acerca de la situación científica actual relacionada con estrés oxidativo en el deporte, microalgas y la microalga *Tetraselmis chuii*, se plantean los siguientes objetivos: Valorar los efectos de la toma de la microalga *Tetraselmis chuii* durante un mes, sobre los parámetros hematológicos habituales de los deportistas; valorar las modificaciones que puede producir la toma en diferentes parámetros bioquímicos y valorar el efecto

de la toma sobre parámetros ergoespirométricos y sobre el posible estado de estrés oxidativo de los deportistas.

Para ello la muestra participante en el estudio estaba compuesta por un total de 32 jugadores de Fútbol pertenecientes al Diocesano CF, que participaron en la división de Honor de Juveniles (máximo nivel nacional) y la liga regional extremeña, con una carga semanal de 8 horas de ejercicio físico. El presente trabajo se basa en un estudio experimental en el que 16 jugadores tomaron durante un mes la sustancia de estudio, sin cambiar ninguna de las actividades diarias que realizaban ni sus hábitos nutricionales y otro grupo de 16 jugadores no tomó nada. Se analizaron las siguientes variables antes del inicio de la toma y el día siguiente a la última toma: variables antropométricas, ergoespirométricas, hematológicas y bioquímicas, que incluyen parámetros generales, de estrés oxidativo y perfil lipídico.

Los resultados obtenidos en la antropometría mostraron un descenso significativo en el sumatorio de 6 pliegues y el porcentaje de grasa corporal. Con respecto a los valores ergoespirométricos, en umbral anaeróbico y final de prueba y tras tres minutos de recuperación, se observó una bajada significativa de la frecuencia cardiaca así como un aumento del consumo máximo de oxígeno tras la suplementación, en los suplementados y no hubo cambios en los no suplementados.

Los datos del hemograma presentaron un aumento altamente significativo en la concentración de hemoglobina y la hemoglobina corpuscular media (HCM) al final del periodo de suplementación, acompañado de un descenso significativo en el valor del hematocrito. Los parámetros bioquímicos pre y post no sufrieron

cambios, todos dentro de los valores considerados normales, lo que nos pone de manifiesto que la toma de la microalga no produjo ningún efecto en el organismo.

Con respecto al perfil lipídico, encontramos que los ácidos grasos palmítico, esteárico y la concentración total de ácidos grasos saturados presentaban valores inferiores tras la suplementación con la microalga. En los parámetros de estrés oxidativo, se observan concentraciones más elevadas de vitamina E, tanto en plasma como en la membrana eritrocitaria.

Tras el presente estudio podemos concluir que la toma de un comprimido al día, durante un mes, de la microalga *Tetraselmis chuii* (tetraSOD®) produce modificaciones en la composición corporal, parámetros de rendimiento, perfil lipídico y parámetros asociados al estrés oxidativo, por lo que podría considerarse un suplemento ergogénico para el deportista. Aún así, consideramos que es necesaria la realización de un estudio con mayor número de participantes, para poder aportar conclusiones que puedan ser extrapolables a mayor población.

PALABRAS CLAVE: *Tetraselmis Chuii*, estrés oxidativo, ejercicio físico.

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

“La práctica del ejercicio regular contribuye a instaurar estilos de vida más saludables y a reducir o eliminar factores de riesgo asociados al sedentarismo” (Dishman y cols. 1985).

Paradójicamente, durante los últimos años, tanto el ejercicio físico como determinados modelos de dieta, han sido ampliamente estudiados como importantes inductores de estrés oxidativo.

En la literatura actual existen evidentes discrepancias, tanto en la propia presencia de estrés oxidativo asociado a diferentes esfuerzos, como en los fenómenos adaptativos que podrían resultar si este desequilibrio persiste durante un periodo determinado.

Posiblemente los condicionantes de estas discrepancias son los diferentes sistemas de muestreo de material biológico susceptible de ser analizado, las diferentes metodologías en cada protocolo de estudio (edad, sexo de la muestra de estudio, intensidad del ejercicio, modalidad deportiva), entre otras variables asociadas al ejercicio menos estudiadas como la climatología durante el estudio.

A lo largo de la historia, el ser humano ha mantenido y mantiene una lucha constante contra el envejecimiento y daño tisular, en continua búsqueda de estilos de vida saludable, sustancias químicas o naturales que logren reducir la muerte celular, mejorar el rendimiento físico o alargar la esperanza de vida.

Los productos naturales son las principales fuentes de nuevas moléculas que se han utilizado en las industrias farmacéutica y nutracéutica desde su creación. La mayoría de los productos naturales actualmente en el mercado

como agentes terapéuticos o como suplementos de salud se derivan de organismos terrestres, incluyendo plantas, animales y microorganismos, aún, cuando el 70% de la superficie de la tierra esta cubierta por oceanos. Los océanos contienen la mayoría de la biodiversidad del planeta y son un recurso enorme para nuevos compuestos biológicamente activos. Los ácidos grasos omega-3 derivados del aceite de pescado proporcionan un ejemplo de productos naturales valiosos del océano con varios beneficios para la salud conocidos (Simopoulos, 1991) y son ampliamente utilizados en las industrias de alimentos funcionales y nutraceuticos. Las microalgas, que se encuentran en el fondo de la cadena alimentaria marina, se consideran una fuente primaria de diversos productos naturales bioactivos (Skulberg, 2000).

Las microalgas son organismos fotoautótrofos que están expuestos a altas tensiones de oxígeno y radicales libres, y por lo tanto han desarrollado varios sistemas protectores eficientes contra especies reactivas de oxígeno y radicales libres (Pulz y Gross, 2004). Por lo tanto, es cada vez más interesante el uso de microalgas como fuente de antioxidantes naturales para cosméticos (por ejemplo, protección solar) y alimentos funcionales / nutraceuticos.

Natrah y cols. (2007) encontraron una actividad antioxidante mayor en extractos crudos de microalgas (por ejemplo, *Isochrysis galbana*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis tetrahele*, *Chaetoceros calcitrans*) en comparación con α -tocoferol, pero inferior al antioxidante sintético butilfenol BHT. Sin embargo, los antioxidantes sintéticos butilfenol BHT y butil anisol BHA son cuestionables en términos de su uso seguro, ya que se cree que son carcinógenos y tumorigénicos si se administran en dosis altas (Schildermann y cols., 1995, Aruoma, 2003).

Un interés considerable se ha centrado en estos organismos unicelulares debido a su capacidad potencial para producir biocombustibles, y como fuente de una amplia gama de subproductos interesantes incluyendo proteínas, grasas, azúcares, carotenoides y muchos otros (Spolaore y cols., 2006).

Varias microalgas (*Chlorella*, *Tetraselmis*, *Spirulina*, *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Navicula*, *Chaetoceros*, *Scenedesmus*, *Haematococcus*, *Cryptothecodinium*), macroalgas (*Laminaria*, *Gracilaria*, *Ulva*, *Padina*, *Pavonica*) y hongos (*Mortierella*, *Saccharomyces*, *Phaffia* y *Vibrio marinus*) puede utilizarse tanto en alimentación de animales terrestres como acuáticos (Harel y Clayton, 2004).

A principios de los años 50, las microalgas se consideraban un buen complemento y / o fortificación en dietas para niños y adultos desnutridos (Spolaore y cols., 2006).

Algunos estudios nutricionales se realizaron con seres humanos y los autores sugieren que el consumo diario de algas debe limitarse a unos 20 g, sin que se produzcan efectos secundarios dañinos, incluso después de un período prolongado de ingesta (Becker, 1988). Gross y cols. (1978) realizaron un estudio de alimentación de algas (*Scenedesmus obliquus*) a niños (5 g / día) y adultos (10 g / día), incorporados a su dieta normal, durante el período de prueba de cuatro semanas. Se midieron datos hematológicos, orina, proteína sérica, concentración de ácido úrico y cambios de peso, y no se encontraron cambios en los parámetros analizados, excepto un ligero aumento de peso, especialmente importante para los niños.

En todo el mundo la producción comercial de microalgas para la nutrición humana ya es una realidad. Numerosas combinaciones de microalgas o mezclas

con otros alimentos saludables se pueden encontrar en el mercado en forma de tabletas, polvos, cápsulas, pastillas y líquidos, como suplementos nutricionales (Tabla 1).

Tabla 1. Principales microalgas comercializadas para la alimentación humana (Adaptado de Pulz y Gross, 2004, Spolaore et al., 2006 y Hallmann, 2007).

Microalga	Mayores productores	Productos	Producción mundial (t/año)
<i>Spirulina (Arthrospira)</i>	Hainan Simai Pharmacy Co. (China) Earthrise Nutritionals (California, USA) Cyanotech Corp. (Hawaii, USA) Myanmar Spirulina factory (Myanmar)	Polvos, extractos, tabletas, bebidas, virutas, pasta y extracto de líquido.	3000
<i>Chlorella</i>	Taiwan Chlorella Manufacturing Co. (Taiwan) Klötze (Germany)	tabletas, polvos, nectar, fideos.	2000
<i>Dunaliella salina</i>	Cognis Nutrition and Health (Australia)	polvo β -caroteno.	1200
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Blue Green Foods (USA) Vision (USA)	capsulas, polvo de cristales, cristales.	500

También pueden incorporarse a los productos alimenticios (por ejemplo, pastas, galletas, pan, bocadillos, caramelos, yogures, refrescos), proporcionando los efectos promotores de la salud asociados con la biomasa de microalgas, probablemente relacionados con un efecto inmunomodulador general (Belay, 1993). A pesar de cierta repulsa de los nuevos alimentos en el pasado, hoy en día hay una creciente demanda de los consumidores de productos alimenticios más naturales, presentando beneficios para la salud. Los alimentos funcionales suplementados con biomasa de microalgas son sensiblemente mucho más convenientes y variables, combinando así los beneficios para la salud con el atractivo para los consumidores (Pulz y Gross,

2004). En algunos países (Alemania, Francia, Japón, Estados Unidos, China, Tailandia), las empresas de producción y distribución de alimentos ya han comenzado actividades serias para comercializar alimentos funcionales con microalgas y cianobacterias (Pulz y Gross, 2004).

Las normas de seguridad alimentaria para el consumo humano son la principal limitación para la explotación biotecnológica de los recursos de microalgas. Concretamente la microalga *Tetraselmis chuii*, aislada por primera vez en los años 50 en las costas de Gran Bretaña (Butcher, 1959), ha sido aislada en diferentes partes del mundo, incluida la bahía de Cádiz. Concretamente en el Puerto de Santa María se encuentra el mayor productor mundial de esta microalga, Fitoplacton Marino S.L.

En septiembre de 2013, el comité científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), emitió un informe concluyendo que el liofilizado de la microalga *Tetraselmis chuii* cumple los criterios para su aceptación como nuevo alimento y consumo en humanos, producido y comercializado por Fitoplacton Marino S.L.

Consideramos que la escasez de estudios relacionados con la ingesta de microalgas; concretamente la *tetraselmis chuii*; sus efectos sobre el estrés oxidativo en deportistas, la posible mejora fisiológica y rendimiento tras su ingesta y por ser reconocida recientemente como “novel food “, justifica el presente estudio de tesis.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El grupo de investigación de Fisiología el Ejercicio de la Universidad de Extremadura, ha venido desarrollando durante años una línea de investigación relacionada con el efecto que produce el ejercicio físico sobre el organismo, centrándose en el estrés oxidativo generado con el ejercicio físico y en la búsqueda de indicadores que permitan conocer qué intensidades y volúmenes de ejercicio son más beneficiosos para la salud y para el rendimiento.

La investigación sobre el estrés oxidativo y la respuesta antioxidante es una línea importante en el ámbito científico actual y de la que se sigue extrayendo información relevante para la puesta en marcha de programas de ejercicio físico y nutrición.

En esta línea, la nutrición y suplementación en el deporte, tiene un papel importante en investigación sobre las mejoras fisiológicas antioxidantes tras la ingesta de determinados alimentos, productos sintéticos, naturales y dietas varias.

Los productos naturales se han utilizado como una fuente prometedora para prevenir y curar enfermedades durante siglos. Muchos de ellos se consumían como una dieta completa o una parte de ella, con el objetivo de obtener beneficios adicionales para la salud más allá de su valor nutricional básico. Aunque las consecuencias biológicas exactas de tales dietas no estuvieron claramente identificadas, las experiencias evolutivas han aportado suficientes conocimientos sobre las propiedades medicinales

de los productos naturales (Cavender, 2006; Dias y cols., 2012). La inspiración en dietas antiguas y su prometedor efecto en la salud dio lugar al desarrollo de una serie de productos naturales a base de productos comerciales. Entre ellos, los alimentos funcionales y los nutraceuticos, los segmentos más dinámicos basados en productos naturales en la industria alimentaria, genera una revolución, creando similitud con las industrias farmacéuticas (Ahamad y cols., 2011, DeFelice, 1995, Schieber, 2012). Ambos conceptos surgieron industrialmente hace pocas décadas.

En pleno siglo XXI, a no ser de una manera sintética o manipulado genéticamente, es muy difícil encontrar un nuevo alimento natural que el ser humano aún no haya consumido.

Nuestro grupo de investigación, entiende, que la clave de la evolución está en el origen, es por ello, que la búsqueda de nuevos alimentos naturales para ser estudiados, nos llevó al lugar donde hace millones de años tuvo origen la vida, el mar.

1.1 ESTRÉS OXIDATIVO Y EJERCICIO FÍSICO

1.1.1 Radicales libres: concepto, tipos y fuentes de producción.

Especies reactivas de oxígeno (ERO) es un concepto que engloba tanto a radicales libres de oxígeno (como puede ser el anión superóxido, radical hidroxilo), así como “non-radical” (reactivos derivados de los radicales libres, como el peróxido de hidrógeno y el ozono) (Halliwell, 1994).

Los radicales libres o ERO son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, capaces de existir de forma independiente (Auroma, 1994), que se producen en todas las células y que presentan una gran inestabilidad. Son especies muy reactivas y con una elevada actividad como aceptores de electrones, lo cual les convierte en potenciales productores de daño a diferentes moléculas del organismo (Halliwell, 1994).

Tienen la capacidad de modificar lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos en lo que se denomina conjuntamente estrés oxidativo de estos compuestos (Dhalla y cols., 2000; Packer, 1997). Los lípidos representan el grupo más susceptible debido a la presencia de sus dobles enlaces en sus ácidos grasos, además de constituir el órgano celular más expuesto, que es la membrana celular. Esto puede causar daño a las células musculares produciendo una alteración en la fluidez de la membrana, cambios en la estructura proteínica, alteraciones en la actividad enzimática, incapacidad de mantener gradientes iónicos, inflamación

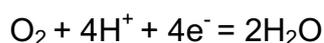
celular e inflamación del tejido. En el interior de la célula, atacan al ADN impidiendo a la célula su reproducción.

Las fuentes de producción de radicales libres son diversas, pudiendo tener origen exógeno o endógeno. Las fuentes exógenas pueden ser factores ambientales contaminantes, anestésicos o hidrocarburos aromáticos que se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación u otros agentes que ya poseen radicales libres como puede ser el humo del tabaco (Mason, 1982).

Respecto a las fuentes de producción endógenas, podemos destacar la actividad de la xantina oxidasa (XO), presente en gran cantidad de tejidos y que funciona como un catalizador en una serie de reacciones, convirtiendo hipoxantina en ácido úrico (Niess y cols., 1996). Los radicales libres también juegan un papel importante en la homeostasis. Son generados y utilizados por células como los neutrófilos, los monocitos, los macrófagos, los eosinófilos y los fibroblastos para eliminar organismos extraños como bacterias y virus. Si la producción de ERO es mayor que la capacidad antioxidante del organismo, se genera un estado de estrés oxidativo con daño celular (Sen, 2001) y el incremento de estos radicales conduce a un deterioro celular que se presenta de forma muy pronunciada en la vejez, periodo en el que se pueden presentar varias enfermedades asociadas al daño oxidativo.

La molécula de oxígeno es un “birradical”, es decir, presenta dos electrones desapareados en su órbita más externa, ambos con el mismo giro paralelo, lo que impide que sea capaz de captar dos electrones de forma simultánea en las reacciones en que interviene. Sólo puede aceptar

los electrones de uno en uno. La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por la acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, aunque se ha estimado que el 4-5% del oxígeno consumido durante la respiración no es completamente reducido a agua, formándose, en su lugar, radicales libres, según la siguiente reacción:



Los intermediarios quedan unidos al sitio activo de la citocromo-oxidasa y no difunden al resto de la célula en condiciones normales, aunque la reducción parcial del oxígeno puede producir estos radicales libres (Reilly y Bulkley, 1990).

De esta forma, el incremento del VO_2 durante el ejercicio lleva asociado un aumento en la producción de radicales libres y la peroxidación lipídica (Bailey y cols., 2004; Clarckson y Thompson, 2000). Incluso el ejercicio moderado puede incrementar la producción de ERO, excediendo la capacidad de las defensas antioxidantes (Alessio, 1993). Las defensas antioxidantes en la célula pueden atenuar la influencia negativa de los radicales libres y reacciones asociadas y protegerla de estos (Sen, 2001; Machlin y Bendich, 1987), creando radicales menos activos o reduciendo el daño producido por el radical libre (Goldfarb, 1999).

Sin embargo, el ejercicio exhaustivo está asociado con la aceleración en la generación de ERO, las cuales pueden inducir efectos adversos en la salud y el bienestar (Aguilo y cols., 2005; Orhan y cols., 2004; Nieman y cols., 2004; Almar y cols., 2002;), provocando cambios

significativos en las defensas antioxidantes propias del organismo produciendo daño celular (Muñoz y cols., 2010; Bloomer y cols., 2006; Vollard y cols., 2005).

Algunos autores consideran que la generación de los radicales libres de oxígeno puede ser producida por una entrada de macrófagos en el músculo y una activación de citoquinas durante el ejercicio de alta intensidad (Sacheck y Blumberg, 2001).

Sin embargo, debido a la redistribución sanguínea durante el ejercicio, algunos tejidos pueden permanecer durante algún tiempo en estado de hipoxia durante la contracción muscular, por lo que durante la relajación existe una mayor utilización de oxígeno en el proceso de reperfusión y por tanto ser susceptibles de peroxidación (Sacheck y Blumberg, 2001; Kanter, 1994).

Actividades de determinadas enzimas, como la XO, durante el ejercicio parece ser otra fuente de producción de radicales libres, puesto que inhibiendo la actividad de esta enzima han reducido el daño oxidativo producido por el ejercicio (Vina y cols., 2000). También parece ser que, a partir de la autooxidación de catecolaminas durante el ejercicio, se pueden producir radicales libres (Ramel y cols., 2004; Rodríguez- Martínez y cols., 1999).

Otro factor que puede influir en la formación de ERO es la producción de ácido láctico, que puede convertir a un radical libre poco dañino, radical superóxido, en otro mucho más perjudicial el perhidroxilo, por la interacción del primero con los protones derivados del ácido láctico.

Existen diferentes tipos de radicales libres, entre los que podemos destacar anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), radical peroxilo (ROO^{\cdot}), oxígeno singlete (1O_2), óxido nítrico (NO^{\cdot}).

1.1.2 Estrés oxidativo

Las células, para combatir el ataque de los radicales libres, disponen de unos mecanismos de defensa denominados sistemas antioxidantes. Cuando estos sistemas son incapaces de neutralizar las acciones oxidativas se producirá en mayor o menor medida un daño celular (Jenkins, 1993). A esta incapacidad de actuación de los mecanismos antioxidantes frente a los radicales libres se le denomina estrés oxidativo, concepto que propuso Sies y Cadenas, en 1985, y que lo definía como “un desequilibrio, en el que hay un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes, en comparación con la situación definida como normal”. El concepto está inspirado en la idea de estrés de Seyle (1976) instalada para el síndrome general de adaptación fisiológica y en la idea de Gerschman de que tanto la hiperoxia como la disminución de antioxidantes llevan a daño tisular.

El estrés oxidativo marca sus efectos en distintos tejidos, donde resaltamos los daños sobre los lípidos. El mayor efecto producido por los radicales libres en los lípidos es la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados, provocando una disfunción en las membranas celulares de las que forman parte (Cheeseman y Slater, 1993; Halliwell y Cross, 1991). Por otro lado, esta excesiva producción de radicales libres

puede ocasionar daños en otros tejidos tales como el ADN, proteínas o glúcidos (Duracková y Gvozdjaková, 2008).

El proceso de peroxidación lipídica se inicia mediante el radical hidroxilo, el radical hidroperoxilo y quizá el oxígeno singlete. El radical extrae un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metileno de la cadena de ácidos grasos, dejando un electrón no apareado, con lo cual genera un radical lipídico (Halliwell, 1994). Este radical lipídico sufrirá un reordenamiento molecular para producir un dieno conjugado, que reacciona con el oxígeno molecular produciendo un radical hidroperóxido. Este radical puede a su vez extraer un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado para formar un nuevo radical lipídico y un hidroperóxido lipídico. El radical lipídico entonces se combina con otra molécula de oxígeno y dará lugar a una reacción en cadena. De este modo, el ataque por un solo radical libre da lugar a la formación de un gran número de especies activadas, lo cual desemboca en la oxidación de una gran cantidad de sustancias (Halliwell, 1994; Cheeseman y Slater, 1993; Halliwell y Cross, 1991).

Los productos finales de la peroxidación lipídica son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, de ellos resaltamos el malondialdehído (MDA), que es un producto de la peroxidación lipídica generada por la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Muchos de estos aldehídos formados pueden reaccionar rápidamente con componentes celulares, pudiendo causar alteraciones en el DNA, y daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Frei, 1994). Asimismo, pueden difundir lejos de su origen y ocasionar edema celular,

además de influir sobre la permeabilidad vascular, inflamación y quimotaxis.

En este sentido, han sido encontrados incrementos de MDA en sangre tras una carrera de 80 km (Kanter y cols., 1993), al finalizar una carrera cuesta abajo (Maughan y cols., 1989) y después de una prueba incremental en cicloergómetro con sujetos sedentarios y moderadamente entrenados (Muñoz y cols., 2010; Sumida y cols., 1989; Lovlin y cols., 1987). Otros estudios muestran como tras una prueba de esfuerzo, los niveles plasmáticos de MDA no aumentaron significativamente en sujetos entrenados y no entrenados después del ejercicio. Si bien, en reposo y 15 minutos después del ejercicio los valores de MDA fueron significativamente menores en sujetos entrenados respecto a los no entrenados (Niess y cols., 1999).

En cambio, existen autores que no han observado incrementos de MDA tras una media maratón (Duthie y cols., 1990), tras 60 minutos de ejercicio en Step (Sen y cols., 1994) y al finalizar un ejercicio máximo en cicloergómetro con deportistas de élite (Vinikka y cols., 1984).

El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas (Shigenaga y cols., 1994). La cantidad de peróxidos lipídicos que llega a formarse en una membrana biológica está determinada por la cantidad de radicales libres que se originan inicialmente y por la propagación de la peroxidación lipídica. Ciertos componentes de la defensa

antioxidante de las células restringen la extensión de esta reacción en cadena, siendo incluso en ocasiones capaces de detenerla completamente.

Las proteínas también constituyen un blanco para las especies reactivas, aunque el efecto sobre ellas es menos intenso que en el caso de los lípidos a causa de una lenta progresión de las reacciones. Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina y la metionina son los que presentan mayor disposición para ser oxidados (Cashmore y cols., 1977). El ataque oxidativo a las proteínas puede provocar modificaciones en aminoácidos específicos, fragmentación de la cadena peptídica, agregaciones o entrecruzamientos, alteraciones de la carga eléctrica o incremento de la susceptibilidad a la proteólisis. También pueden producirse cambios irreversibles que inhiban la función enzimática (Shacter, 2000; Dean y cols., 1997).

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina o arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadman, 1992).

Por otra parte, y cómo hemos comentado anteriormente, el ADN también es susceptible de daño oxidativo. El oxígeno se adiciona a las bases del ADN formándose radical peroxilo. Las posteriores reacciones de estas especies reactivas del ADN dan lugar a un gran número de productos entre los que destaca la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, utilizado como marcador de peroxidación. Este producto aparece como consecuencia de la modificación oxidativa que se produce a nivel de la guanosina. También

el radical hidroxilo es capaz de atacar las desoxirribosas, purinas y pirimidinas, generando numerosos productos (Halliwell y Aruoma, 1991).

Debemos destacar que el daño oxidativo asociado a proteínas y al ADN no debe ser considerado de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadores del ADN puede aumentar la acumulación de daño oxidativo al mismo, por lo que pueden potenciar el uno al otro. Cuando la replicación del ADN dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un ADN dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar la mutación (Breen y Murphy, 1995; Halliwell y Aruoma, 1991). Así pues, las lesiones oxidativas al ADN parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas al envejecimiento. El ADN dañado es reparado por enzimas que cortan la parte dañada y ésta es eliminada mediante su excreción por orina (Viguie y cols., 1993).

Por último, cabe destacar el daño oxidativo producido por los glúcidos. Los glúcidos reaccionan con facilidad con los radicales hidroxilos. Los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres dando lugar a procesos degenerativos (Monboisse y cols., 1988).

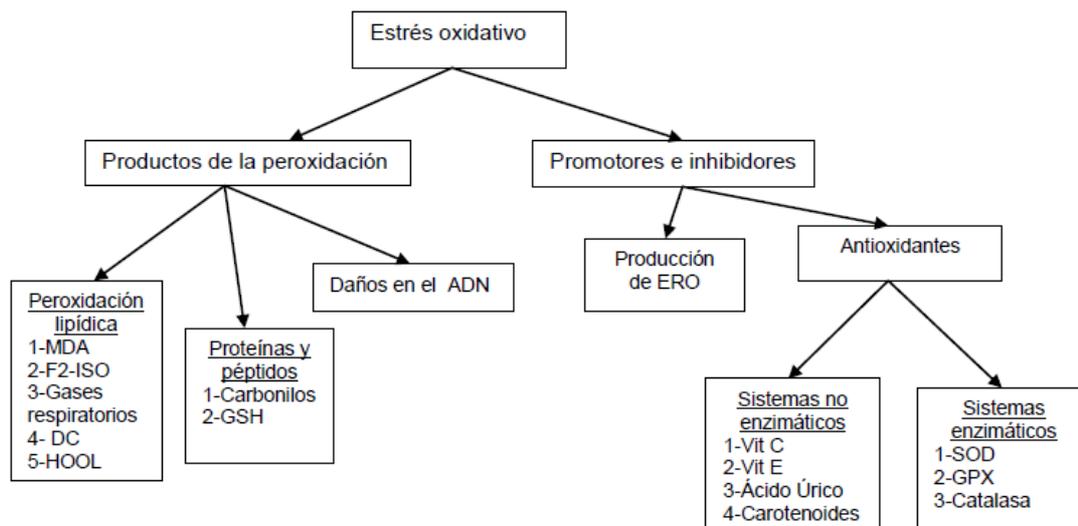


Figura 1. Composición del estrés oxidativo y métodos utilizados para su evaluación (modificado de Dotan, 2003).

Para diagnosticar el daño producido por las especies oxidativas, resulta complicado medir sus niveles en fluidos biológicos ya que su vida media es de fracciones de segundo, por este motivo se recurre a la cuantificación de distintos marcadores indirectos entre los que destacan: Malondialdehido (MDA) (Noberasco y cols., 1991), como marcador de peroxidación lipídica, incrementos de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Halliwell y Grootveld, 1987), dienos conjugados (Vuorimaa y cols., 1999), cociente entre glutatión oxidado y glutatión reducido (GSSG/GSH), como daño producido en el citosol, así como pentano o etano exhalado, o modificaciones en orina del nucleosido 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, como marcador de daño oxidativo en el ADN (Shigenaga y cols., 1989) o el incremento en los ácidos grasos saturados de cadena corta o media en las membranas de las células (Halliwell y

Gutteridge, 1985). Muchos avances en el campo del estrés oxidativo han sido posibles por una sustancial mejora de las técnicas de medida a lo largo de los últimos treinta años, así como el aumento del uso y disponibilidad de herramientas necesarias para las mediciones (Fisher- Wellman y Bloomer, 2009).

Actualmente, técnicas como la detección directa de malondealdehído (MDA) usando cromatografía líquida de alta presión (HPLC) están reconocidas como las medidas más válidas de la peroxidación lipídica en muestras biológicas de humanos tales como sangre y orina (Meagher y FitzGerald, 2000). El MDA es comúnmente medido por su reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA), aunque la medición con TBA no es específica del MDA (esto provoca una sobreestimación del MDA), este método es aceptado como un marcador general de peroxidación lipídica, pero los resultados deben ser tomados con precaución (Knez y cols., 2006; Groussard y cols., 2003; Clarkson y Thompson., 2000; Rimbach y cols., 1999).

Halliwel y Chirico (1993) sugieren que la separación de los productos de la peroxidación con cromatografía líquida de alta presión (HPLC) antes de la medición aumenta notablemente la exactitud de la medida.

La cuantificación plasmática de vitaminas antioxidantes (vitamina A, C y E) es un método común para medir la protección antioxidante y para detectar deficiencia vitamínica (Prior y Cao, 1999; Rimbach., 1999). Al igual que las enzimas antioxidantes, las concentraciones de vitaminas

antioxidantes se modifican en la presencia de estrés oxidativo y pueden ser marcadores indirectos de estrés oxidativo (Rimbach y cols., 1999).

1.1.3 Sistemas antioxidantes

Para hacer frente al ataque de los radicales libres y el consecuente daño celular, el organismo cuenta con una serie de respuestas de defensa denominados “sistemas antioxidantes”, cuyo objetivo es mantener el estado de equilibrio que existe entre oxidantes y antioxidantes (Evans y Halliwell, 2001).

Se definen como compuestos que protegen el sistema celular de efectos potencialmente perjudiciales en los procesos que puedan causar una oxidación excesiva (Duthie y Crozier, 2000). Deben estar presentes en el organismo en una concentración suficiente que permita prevenir la acumulación de elementos pro-oxidantes.

Pueden actuar previniendo la formación de ERO, interceptando el ataque de los mismos, captando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en las moléculas menos reactivas, incrementando la resistencia al ataque de las especies reactivas en las células diana, facilitando la reparación del daño provocado por los radicales libres y manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes. Tienen la capacidad de competir con otros sustratos oxidables y por tanto retrasar o inhibir la oxidación de dichos sustratos (Halliwell y Gutteridge, 1985). El antioxidante, al reaccionar con el radical libre, le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil no tóxico que, en algunos casos,

puede volver a su estado inicial mediante la actuación de otros antioxidantes.

Debido a la diversidad en la vida media de los prooxidantes, desde nanosegundos hasta varios segundos, existen diferentes sistemas de defensas para hacerles frente (Sies y Stahl, 1995). De esta forma se han desarrollado varias líneas de defensa, y con distintos objetivos, ya sean de prevención, interceptación o reparación (Sies, 1993).

Los sistemas antioxidantes, según su naturaleza, se enmarcan bajo dos tipos:

1. Sistemas antioxidantes enzimáticos.
2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos.

Los sistemas antioxidantes enzimáticos son diversas enzimas celulares específicas para la neutralización de las especies reactivas generadas en los procesos redox celulares. Su función es la de prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar las especies de oxígeno parcialmente reducidas (O_2^- , H_2O_2) (Winston, 1990).

Dentro de este tipo de sistemas antioxidantes enzimáticos nos encontramos la superóxido dismutasa (SOD), que es la enzima que cataliza la dismutación del radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno (Weiss y cols., 1983), la glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa que son las enzimas que reducen el agua oxigenada o el hidroperóxido orgánico a agua y alcohol respectivamente, y forma parte de los antioxidantes primarios, convirtiendo los radicales libres en compuestos menos dañinos,

o impidiendo su formación. La actividad catalasa es tres veces superior en los atletas de fondo que, en los atletas de corta distancia, posiblemente por la mayor concentración de O₂ que movilizan los primeros (Kostaropoulos, 2006).

Además de los antioxidantes enzimáticos, la célula dispone de un conjunto de sistemas no enzimáticos que permiten contrarrestar la acción oxidativa de los radicales libres. Fundamentalmente, los antioxidantes no enzimáticos están constituidos por vitaminas y micronutrientes (Sies y Stahl, 1995). Estos mecanismos deben estar presentes en todos los compartimentos celulares, de ahí que existan antioxidantes hidrosolubles (vitamina C, glutatión) y liposolubles (vitamina E y A).

Tabla 2. Localización y acciones de las principales vitaminas antioxidantes (modificado de Finaud y cols., 2006).

Antioxidante	Localización	Acciones	Objetivos
Vitamina A (retinol)	Lípidos/Membranas celulares	Reproducción de la peroxidación lipídica	¹ O ₂ - ROOH
Vitamina C (ácido ascórbico)	Medio acuoso, Citosol, Fluidos extracelulares	Regeneración de la vitamina E Protección de las LDL	OH [•] -O ₂ ^{-•}
Vitamina E (α- tocoferol)	Lípidos Membranas celulares	Inhibición de la peroxidación lipídica Estabilización de la membrana	ROOH- ¹ O ₂

Es el antioxidante soluble en lípidos más conocido por su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica debido a la eliminación de los ERO y por preservar las membranas celulares (Schurks y cols., 2010). De igual manera, en plasma (Burton y cols., 1982), y eritrocitos (Burton y cols., 1983), la vitamina E es el antioxidante liposoluble que protege a los lípidos del daño peroxidativo.

Al neutralizar la vitamina E a un ERO, se produce la formación del radical vitamina E, disminuyendo así el contenido celular de ésta. El radical vitamina E (oxidada) se recicla a vitamina E (reducida) mediante antioxidantes como el glutatión o el ácido ascórbico, sobre todo (Burton y Traber, 1990).

El déficit de vitamina E es frecuente en población occidental sana (Mittmesser y cols., 2000), pudiendo tal deficiencia incrementar el estrés oxidativo y la fatiga asociada con el descenso de la capacidad oxidativa y la resistencia (Coombes y cols., 2001; Evans, 2000; Goldfarb, 1999). Muchas membranas celulares muestran un progresivo y específico incremento en la susceptibilidad hacia el daño oxidativo con un incremento del nivel de deficiencia de vitamina E y estrés físico (Quintanilha y Packer, 1983).

La respuesta de este sistema antioxidante ha sido observada tras la realización de esfuerzos de diversas intensidades. Por ejemplo, en un grupo de sujetos entrenados tras una prueba de esfuerzo máxima, los niveles eritrocitarios en vitamina E sufrieron un descenso, aunque sin llegar

a la significación estadística, encontrando valores más bajos de este parámetro que en plasma, ya que en el interior celular podrían actuar de forma mucho más notoria las enzimas antioxidantes como la SOD, cuya actividad se incrementa como consecuencia de la producción del anión superóxido, y por lo tanto, la utilización de esta vitamina sería menor (Marzatico y cols., 1997). En cualquier caso, el descenso podría ser atribuible a su actuación cuando otros sistemas antioxidantes no son capaces de neutralizar los radicales libres de oxígeno responsables de la peroxidación lipídica (Bowles y cols., 1991).

Si el ejercicio aumenta el estrés oxidativo, deben ser oxidadas grandes cantidades de vitamina E, y los niveles plasmáticos de α -tocoferol deberían disminuir (Aguilo y cols., 2005).

Gran cantidad de estudios han investigado los efectos de la vitamina E en el rendimiento y no han encontrado efectos beneficiosos en medidas de resistencia y capacidad aeróbica (Gerster, 1991; Lawrence y cols., 1975; Lawrence y cols., 1975; Shephard y cols., 1974; Sharman y cols., 1971).

En un estudio de Duthie (1990), se midió la vitamina E una hora antes de un medio maratón dando un valor de 7,2 $\mu\text{g/mL}$, encontrándose a los cinco minutos de recuperación una concentración de 8,3 $\mu\text{g/mL}$. En otro estudio que trató de observar la adaptación de los linfocitos al ejercicio exhaustivo se encontraron concentraciones de 6,53 $\mu\text{g/mL}$ (Tauler y cols, 2006).

1.1.3.2 Vitamina A

Es un antioxidante de naturaleza lipídica, gracias a su corta cadena de polieno que le permite moverse con facilidad en la membrana plasmática combatiendo la peroxidación lipídica, rompiendo el ciclo de ésta e interactuando con los radicales peroxilo (Palace y cols., 1999). Debido a que el organismo no la puede sintetizar, es necesaria su ingesta mediante la dieta (Palace y cols., 1999).

Participa en numerosas funciones primordiales en el ser humano, teniendo un rol muy importante en la agudeza visual, la proliferación y la diferenciación celular, en la acción antioxidante y en la actividad inmunológica. El término vitamina A representa terminológicamente al retinol y a los carotenoides, que son, respectivamente, el antecedente y los precursores de la vitamina A. El β -caroteno tiene una actividad antioxidante cinco veces mayor que la del retinol (Ribeiro Nogueira y cols., 2009). La vitamina A en altas dosis puede ser potencialmente tóxica (Rothman y cols., 1995).

En cuanto a los efectos de un esfuerzo físico de intensidad moderada en esta vitamina a nivel eritrocitario, se han observado descensos, sin alcanzar la significación estadística, debido seguramente a su utilización en la neutralización de radicales libres de oxígeno, derivados del incremento de VO_2 durante la prueba (Ramel y cols., 2004).

Es importante señalar que los efectos antioxidantes de la vitamina A se potencian en presencia de vitamina E, y que este efecto es máximo en una proporción 1:10 (retinol: tocoferol), que es precisamente la proporción

que guardan estos compuestos en las membranas de las células biológicas. Este efecto coayudante se atribuye a su protección en diferentes localizaciones físicas, la vitamina E desde la parte exterior de la superficie de las membranas, y la vitamina A desde la interior (Niki y cols., 1995; Palace y cols., 1999).

La vitamina A es una vitamina liposoluble presente en muchas sustancias lipídicas. El β -caroteno, presente en el organismo, se convierte en vitamina A cuando el mismo lo necesita (Powers y Lennon, 1999; Ozhogina y Kasaikina, 1995). Los carotenoides pueden atrapar directamente radicales libres (Olson, 1993), teniendo que ser incorporados en la ingesta nutricional (Rousseau y cols., 2004).

Aunque menos importante que la vitamina E en el sistema antioxidante, el β -caroteno y la vitamina A actúan conjuntamente con la vitamina C y la vitamina E en la protección de las células contra las ERO (Livrea y cols., 1995).

En algunos estudios se encuentran incrementos significativos de la concentración de vitamina A como consecuencia del ejercicio (Aguilo y cols., 2005; Aguilo y cols., 2003; Margaritis y cols., 2003), incluso alcanzando el valor máximo a los cinco minutos de haber finalizado el esfuerzo, manteniendo al sujeto parado (Duthie y cols., 1990). Sin embargo, en otro estudio previo de nuestro grupo, se observa un descenso de la vitamina A en plasma tras la realización de un esfuerzo máximo en sujetos con diferentes niveles de entrenamiento (Olcina y cols., 2006).

Duthie (1990) midió una hora antes la vitamina A en un medio maratón encontrándose concentraciones de 0,85 µg/mL, hallándose a los cinco minutos de recuperación una concentración de 1,0 µg/mL.

1.1.3.3 Vitamina C

La vitamina C es el antioxidante exógeno más abundante encontrado en plasma y fluidos intersticiales, que protege frente a la peroxidación lipídica en plasma (Frei y cols., 1989). También denominada ácido ascórbico, es un compuesto altamente polar, soluble en agua e insoluble en medios lipídicos. Está presente en la mayoría de tejidos y es especialmente abundante en el tejido adrenal (Senturk y cols., 2005a), siendo considerado como el antioxidante natural menos tóxico.

La vitamina C es hidrosoluble y puede reaccionar directamente con el anión superóxido, radicales hidróxilos y oxígeno (Sauberlich, 1994) y tiene la capacidad de neutralizar las ERO (Bigard, 2001).

En el interior de las células, la vitamina C refuerza la acción de la vitamina E y el GSH, regenerando sus formas activas, después de que hayan reaccionado contra los ERO (Knez y cols., 2006; Evans, 2000; Ashton y cols., 1999).

El incremento del ácido ascórbico se correlaciona significativamente con un incremento del cortisol, sugiriendo los autores que esta relación es debida a la activación de las glándulas adrenales (Gleeson y cols., 1987).

Inhibe la oxidación de lipoproteínas de alta densidad (HDL), permitiendo así que éstas mantengan su capacidad cardioprotectora

(Hillstrom y cols., 2003). No obstante, a altas concentraciones puede tener un efecto pro-oxidante en presencia de metales de transición como el hierro o el cobre (Frei, 1994).

Este mecanismo pro-oxidante se fundamenta en la capacidad para reducir el hierro férrico a ferroso (reacción de Fenton), cuando la concentración tisular de hierro es elevada, ya que éste es un potente inductor de radicales, especialmente radical hidroxilo mediante la reacción de Haber-Weiss. Por este motivo, la megadosis de vitamina C, ha sido cuestionada por algunos autores (Serturk y cols., 2005).

Normalmente, en concentraciones bajas de ascorbato, este tiende a ser pro-oxidante, mientras que, a altas concentraciones tenderá a ser un antioxidante (Mandl y cols., 2009).

En relación a mediciones realizadas durante el transcurso de diferentes protocolos de esfuerzo, los datos aportados por Camus y cols. (1994) indican un descenso de la concentración plasmática de ácido ascórbico a los 20 minutos de ejercicio de carrera cuesta abajo e inmediatamente después de la finalización del esfuerzo, mientras que a los 20 minutos de recuperación los valores eran aproximados a los de reposo. En el protocolo de caminata cuesta arriba hubo tan solo pequeños cambios en estas concentraciones.

En cuanto a la respuesta eritrocitaria de esta vitamina ante esfuerzos de intensidad máxima, encontramos descensos estadísticamente significativos (Koz y cols., 1992). Este descenso podría ser debido a su utilización para combatir la producción de radicales libres, aunque no se

han encontrado estudios que hagan referencia a este suceso. Otra explicación, podría ser la salida de vitamina C al plasma, ya que a nivel celular existe un incremento en la actividad enzimática antioxidante (Mena y cols., 1991), que constituye la primera barrera para combatir la producción de ERO.

Dentro de las funciones que posee, se encuentra la síntesis de colágeno, de norepinefrina, de carnitina, e incluso algunos estudios sugieren que está envuelta en el metabolismo del colesterol a ácidos biliares, lo cual a su vez tiene implicaciones en los niveles de colesterol en sangre (Simon y Hudes, 2000).

En la mayoría de los estudios revisados se observa un incremento de la concentración de vitamina C como consecuencia del ejercicio (Olcina y cols., 2006; Jammes y cols., 2004; Rousseau y cols., 2004; Ramel y cols., 2004; Aguilo y cols., 2003; Chevion y cols., 2003; Margaritis y cols., 2003; Palmer y cols., 2003; Manoharan y Schwille., 1994; Duthie y cols., 1990; Gleeson y cols., 1987; Ames y cols., 1981).

Un hecho significativo es el que aparece en el estudio aportado por Jammes y cols. (2004), en el que se observó un primer descenso de la concentración de ácido ascórbico durante la recuperación, seguido de un aumento de la concentración y un posterior y último descenso a los treinta minutos de haber finalizado el esfuerzo.

Atendiendo a las adaptaciones producidas por el ejercicio en los sistemas antioxidantes, gran cantidad de estudios han observado que la actividad física practicada de manera regular puede llegar a reducir los

valores relativos del estrés oxidativo y mejorar la capacidad antioxidante total del organismo (Radak y cols., 2001; Mena y cols., 1991; Robertson y cols., 1991; Alessio y Goldfarg, 1988). Se examinaron los niveles de diferentes marcadores antioxidantes de corredores con un alto grado de entrenamiento, moderadamente entrenados y sujetos sedentarios, llegando a la conclusión que la capacidad antioxidante era mejor en los corredores con un alto grado de entrenamiento (Mena y cols., 1991). Los deportistas de mayor grado de entrenamiento tenían mayor cantidad de vitamina E eritrocitaria, glutatión y actividad catalasa, existiendo una relación significativa positiva entre los metros recorridos semanalmente y la actividad antioxidante de las enzimas eritrocitarias.

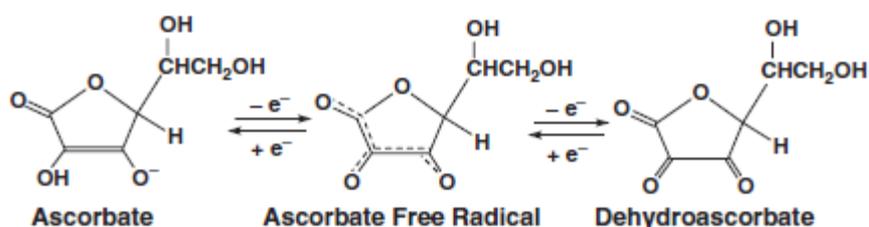


Figura 3. Transformaciones del ascorbato (Duracková y Gvozdjácová, 2008).

En un test máximo, uno submáximo y una etapa ciclista se encontró como dato máximo 14,3 $\mu\text{g/mL}$ (Aguiló, 2003).

1.1.4. Actividad física, estrés oxidativo y respuesta antioxidante

Como hemos visto, el ejercicio físico incrementa la necesidad del aporte de oxígeno a los tejidos, causando un incremento en la producción de radicales libres. Como hemos comentado antes, cuando esta producción de ERO excede la capacidad antioxidante del organismo, se genera un desequilibrio que provoca estrés oxidativo y daño celular (Sen, 2001).

La intensidad y la duración del ejercicio son factores importantes relacionados con la producción de estos radicales libres (Johnson y cols., 2011; Muñoz y cols, 2010). Incluso durante la recuperación del ejercicio físico, las células sanguíneas pueden por sí mismas producir cantidades significativas de ERO. Los mayores generadores de ERO se localizan en la sangre durante el ejercicio y pueden ser eritrocitos (debido principalmente a su cantidad) y leucocitos (debido a la activación drástica durante el ejercicio) (Nikolaidis y Jarmutas, 2009).

Existen un gran número de estudios que evidencian que los radicales libres juegan un papel importante como mediadores del daño muscular e inflamaciones producidas como consecuencia del ejercicio extenuante. Se dice que la generación de radicales libres de oxígeno se incrementa durante el ejercicio como resultado del aumento en el VO_2 mitocondrial y el mayor flujo de electrones en la cadena de transporte (Alessio, 1993). Muchos estudios revisados muestran incrementos significativos en MDA después de un ejercicio hasta la extenuación y cambios en los niveles plasmáticos de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Muñoz y cols, 2010; Ashton y cols., 1999; Dekkers y cols., 1996).

Durante los últimos años se han estudiado los efectos y las diferencias existentes entre los ejercicios de máxima intensidad (hasta el agotamiento), y ejercicios de intensidad submáxima de diferente duración, sobre los indicadores de estrés oxidativo y respuesta antioxidante del organismo. En principio, parece ser que, a mayor intensidad de esfuerzo, se produce un mayor incremento en la peroxidación lipídica que provoca aumentos en los niveles de MDA, como consecuencia de un mayor estrés oxidativo (Sacheck y Blumberg, 2001; McBride y cols., 1998; Alessio y cols., 1988; Weiss y cols., 1983), aunque los cambios producidos en éste y otros parámetros, también pueden estar influidos por la duración del esfuerzo.

Se ha sugerido que en respuesta a una simple ejecución de ejercicio hay una intensidad por debajo de la cual parece no existir estrés oxidativo (Alessio, 1993), así como hay evidencias para pensar que la excesiva producción de radicales libres ocurre sólo cuando el ejercicio es exhaustivo (Muñoz y cols., 2010; Sastre y cols., 1992). Para Lovlin y cols. (1987) los niveles de MDA se incrementan a partir de una intensidad de un 70% del VO_2 máx.

Altos volúmenes de ejercicio están también asociados con una elevación de las defensas antioxidantes contra el daño oxidativo y el nivel de entrenamiento puede influir en la magnitud de la adaptación de esas defensas (Knez y cols., 2006; Mena y cols., 1991). En definitiva, tanto en ejercicio aeróbico (Vollaard y cols., 2005) como el ejercicio anaeróbico (Bloomer y cols., 2005) han sido ampliamente estudiados en relación con el estrés oxidativo.

Por otro lado, Kostka y cols., (1998), llevaron a cabo un estudio en el que intentaban determinar la relación que podía existir entre el VO_2 máx, estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante en sujetos de avanzada edad, llegando a la conclusión de que existe una relación directa entre los niveles de VO_2 máx y MDA, mientras que la relación es inversa entre el VO_2 máx y parámetros antioxidantes, estableciendo que la intensidad del ejercicio puede ser un factor desfavorable relacionado con la actividad saludable.

En un estudio con sujetos de avanzada edad, se llevaron a cabo pruebas de esfuerzo hasta el agotamiento, encontrando que los sujetos entrenados presentaban menores niveles de MDA tras el esfuerzo, mayor capacidad total antioxidante, y mayor actividad de GPX que los no entrenados (Fatouros y cols., 2004). Igualmente, nadadores jóvenes, tras un periodo de entrenamiento, presentaban mayor actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, catalasa y GPX, mientras que en el grupo control, los niveles de MDA eran más elevados que en el grupo de entrenados (Cavas y Tarhan, 2004).

En otro estudio, donde los sujetos realizaban esfuerzos de máxima intensidad y de 30 segundos de duración (test de Wingate), se observaban incrementos en los niveles plasmáticos de MDA, descensos en ácido úrico y vitamina E, y no encontraron cambios significativos en los niveles de vitamina A, (Baker y cols., 2004). Sin embargo, en otro estudio con el mismo protocolo (test de Wingate), observaron incrementos plasmáticos en ácido úrico y vitamina C, y descensos en vitamina E y beta carotenos (Groussard y cols., 2003). Estudios realizados en ratas, también mostraban

incrementos en los niveles de MDA, aunque se observaban descensos en los niveles de vitamina C, en relación a la duración del ejercicio (Koz y cols., 1992).

Robertson y cols. (1991) examinaron el estatus antioxidante de corredores altamente entrenados, moderadamente entrenados y sedentarios y encontraron que la capacidad antioxidante era mejor en los corredores altamente entrenados. Éstos tenían mayor cantidad de vitamina E eritrocitaria, glutatión y actividad de la catalasa, y existía una relación significativa entre la distancia recorrida semanalmente y la actividad eritrocitaria de las enzimas antioxidantes.

Gran cantidad de estudios han señalado que el ejercicio puede disminuir la reserva tisular de antioxidantes tales como la vitamina E y la vitamina C, consideradas junto con los β -carotenos como las vitaminas antioxidantes primarias (Clarckson y Thompson, 2000), y que también pueden ser transferidos de un compartimento del cuerpo como resultado del ejercicio (Bowles y cols., 1991; Packer, 1984; Quintanilha y Packer, 1983). Por otro lado, algunos autores han indicado que las concentraciones plasmáticas de tocoferol y ácido ascórbico están aumentadas tras el ejercicio intenso (Muñoz y cols., 2010; Aguilo y cols., 2003; Camus y cols., 1990; Pincemail y cols., 1988; Gleeson y cols., 1987; Fishbaine y Butterfield, 1984). Sin embargo, la mayoría no explican las variaciones inducidas por el ejercicio en el volumen plasmático (Clarckson y Thompson, 2000).

La vitamina E, en sangre, es transportada unida a lípidos sanguíneos. Se recomienda precaución en la interpretación de concentraciones plasmáticas de antioxidantes debido a las variaciones, durante el ejercicio o el entrenamiento, que puede representar una redistribución entre los tejidos y el plasma (Ji, 1995).

En referencia a la vitamina C, como uno de los sistemas antioxidantes no enzimáticos explicados con anterioridad, Duthie y cols. (1990) encontraron un incremento de la concentración plasmática de ácido ascórbico a los cinco minutos de la finalización de una media maratón, retornando los valores a niveles normales transcurridas 24 horas, por lo que sugiere que estos cambios pudiesen probablemente ser debidos a la disminución del 6% de volumen plasmático, siendo éste un aspecto que no se tiene en cuenta a menudo y que puede ser fundamental en la interpretación de los resultados. Siguiendo esta línea, en un estudio anterior de nuestro grupo, se encontró un aumento inmediato de la vitamina C para tres grupos diferentes de sujetos; sedentarios, moderadamente entrenados y entrenados. Este aumento se produjo desde el inicio hasta el final de una prueba de esfuerzo incremental máxima en cicloergómetro y en la recuperación se observó un descenso a los 5 minutos y un nuevo aumento a los 15 minutos (Brazo-Sayavera, 2011).

El estrés oxidativo que resulta del ejercicio puede ser potencialmente minimizado con antioxidantes de la dieta tales como la vitamina C (ácido ascórbico) y vitamina A (retinol) y E (α -tocoferol) (Allen, R.G. y Tresini, 2000; Dekkers y cols., 1996; Kanter y cols., 1993), siendo la nutrición la que

provee gran cantidad de ellos (Watson y cols., 2005; Laursen, 2001; Powers y Lennon, 1999).

En cuanto a las dudas que aporta la literatura, no hay datos disponibles en la bibliografía sobre la relación entre la intensidad del ejercicio y los efectos producidos en los niveles plasmáticos de vitaminas antioxidantes (Aguilo y cols., 2003). Al igual que no está claro por qué los estudios que examinan las concentraciones de vitaminas C y E durante y después del ejercicio muestran diversos resultados. Esta variabilidad puede ser debida a las diferencias en el protocolo de ejercicio utilizado, los puntos temporales examinados, el nivel de entrenamiento de los sujetos, factores ambientales o falta de control de los cambios que se producen en el volumen plasmático (Clarkson y Thompson, 2000). Maxwell y cols. (1993) señalan que la intensidad del ejercicio y el nivel de entrenamiento de los sujetos pueden afectar a los resultados.

Con respecto a la respuesta de los sistemas antioxidantes no enzimáticos (vitamina E, C y A) ante esfuerzos de intensidad máxima, los estudios encontrados no revelan datos esclarecedores, puesto que la mayoría de ellos estudian los efectos de la suplementación de estas vitaminas sobre parámetros de estrés. Podemos encontrar algunos trabajos en los que se observaron incrementos en los niveles de vitamina C (Santangelo y cols., 2003; Weiss y cols., 1983), y descensos en los niveles de vitamina E (Surmen-Gur y cols., 1999). Resultados idénticos obtuvieron en un estudio en el que llevaron a cabo pruebas de esfuerzo hasta la extenuación con jugadores de fútbol (Klapcinska y cols., 2005).

Entre los resultados derivados de estos estudios, citamos el aumento de lactato, mientras que los niveles de MDA no se modificaron significativamente. Los niveles de vitamina E disminuyeron significativamente tras el ejercicio (Muñoz y cols., 2010; Surmen-Gur y cols., 1999).

Según algunos autores, existen diferencias en cuanto a la respuesta antioxidante y el efecto de la formación de radicales libres según el grado de entrenamiento. Así, en pruebas de esfuerzo máximas, hasta la extenuación, sujetos sedentarios muestran mayores alteraciones en cuanto a deformación y agregabilidad de glóbulos rojos, que sujetos entrenados. Tras el periodo de suplementación con vitaminas A, E y C, estas modificaciones eran menores, e incluso los niveles de MDA (Senturk y cols., 2005b).

Estos mismos autores sugieren que el estrés oxidativo provocado por el ejercicio físico afecta a la fragilidad osmótica de los eritrocitos, la hemólisis, produciendo un incremento en la hemoglobina plasmática y descenso en los niveles de haptoglobina. Estas modificaciones son más acusadas en sujetos sedentarios que en entrenados (Yalcin y cols., 2000; Senturk y cols., 2005a).

En definitiva, para tener una mejor estimación del nivel de estrés oxidativo al que se somete el organismo cuando realiza actividad física es recomendable la medición de varios marcadores biológicos, como pueden ser los de daño oxidativo o los de respuesta antioxidante (Brancaccio y cols., 2010).

1.2 MICROALGAS

1.2.1 Fitoplancton, origen de la vida.

Se denomina fitoplancton al conjunto de los organismos acuáticos autótrofos del plancton, que tienen capacidad fotosintética y que viven dispersos en el agua.

El fitoplancton se encuentra en la base de la cadena alimentaria y de los ecosistemas acuáticos, ya que sirve de alimento a organismos mayores; es decir realiza la parte principal de la producción primaria en los ambientes acuáticos, sobre todos los animales marinos.

Pero además de eso, el fitoplancton es el responsable original de la presencia de oxígeno (O_2) en la atmósfera. La fotosíntesis oxigénica, apareció evolutivamente con las cianobacterias, además de los plastos de las algas eucarióticas. Durante casi 2.000 millones de años, hasta el desarrollo de las plantas terrestres, la fotosíntesis estuvo prácticamente restringida a los mares. La mayor parte de la producción primaria fotosintética de los mares, entonces como ahora, es atribuible al fitoplancton (Thurman, 1997).

A partir de la oxigenación de la atmósfera, gracias a las cianobacterias, surge el primer tetrápodo, evolucionado de pez a vertebrado terrestre, el Tiktaalik. Vivió hace unos 375 millones de años, es el eslabón perdido de cómo un grupo de peces desarrollan patas para moverse en tierra firme antes de originar los tetrápodos modernos, de los

que forman parte la especie humana (Daeschler y cols., 2006; Shubin y cols., 2006).

Cuando se habla de microalgas, se asocian a problemas por el deterioro de la calidad del agua, abastecimiento, pesca, recreación y ocio o riesgos para la salud. En consecuencia, las características negativas de las microalgas han ganado generalmente la atención primaria de la investigación, así como los medios prácticos de cómo controlar su crecimiento cuando son indeseables (Reynolds, 1991).

Sin embargo, como comentamos, es un hecho bien conocido que los microorganismos marinos representan más del 90% de la biomasa marina (DeLong, 2007), son la línea delantera de las cadenas alimenticias marinas y actúan como pulmón vivo para el planeta produciendo más de la mitad del oxígeno terrestre.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos microscópicos que se encuentran tanto en ambientes marinos como de agua dulce. Su mecanismo fotosintético es similar al de las plantas terrestres. Por lo general son más eficientes en la conversión de la energía solar en biomasa, principalmente debido a su estructura celular simple y sumergida en un medio acuoso con acceso al agua, CO₂ y otros nutrientes. Estos organismos constituyen un grupo polifilético y altamente diverso de organismos procariotas y eucariotas. La clasificación en divisiones se basa en diversas propiedades como la pigmentación, la naturaleza química del producto de almacenamiento fotosintético, la organización de las membranas fotosintéticas y otras características morfológicas. Las clases de microalgas más abundantes son *Cyanophyceae* (algas verde-azuladas),

Chlorophyceae (alga verde), *Bacillariophyceae* (incluyendo las diatomeas) y *Chrysophyceae* (incluyendo algas doradas).

La comunidad microbiana marina extraordinariamente diversa produce compuestos con propiedades estructurales únicas y estos compuestos poseen un amplio espectro de propiedades farmacéuticas tales como antimicrobianos, anti-tuberculosos, antivirales, antiparasitarios, antihelmínticos, antipalúdicos, antiprotozoarios, anticoagulantes, antiplaquetarios, antiinflamatorios, diabéticos y antitumorales (Imhoff y cols., 2011).

1.2.2. Composición Bioquímica de microalgas

Si comparásemos la composición bioquímica de las microalgas con la de los alimentos tradicionales sería posible que estas fueran capaces de aumentar el contenido nutricional de los alimentos tradicionales e incluso afectar positivamente tanto a la salud humana como animal. Esto es debido a su original composición química.

El alto contenido proteico de varias especies de microalgas es una de las principales razones para considerarlas como una fuente de proteína no convencional. A su vez, el perfil de aminoácidos de casi todas las algas es más favorable que el comparado con las fuentes convencionales.

Las microalgas marinas se consideran como fuente potencial de proteínas de alta calidad. El contenido proteico de algunas especies de microalgas, incluyendo *Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus*, *Dunaliella*, *Micractinium*, *Oscillatoria*, *Chlamydomonas* y *Euglena*, representa más del

50% del peso seco y estas proteínas tienen un alto valor biológico. En el caso de *S. platensis*, aproximadamente el 80% del nitrógeno proteico podría extraerse de la biomasa desgrasada con hexano. Por lo tanto, *S. platensis* se considera como una fuente principal de proteínas bioactivas en el medio marino. Además, especies como *Spirulina* y *Chlorella* con valores biológicos de 77,6% y 71,6%, respectivamente, no sólo han sido reconocidas como fuentes de alta calidad de proteínas, sino también como fuentes potenciales de proteínas bioactivas. Las proteínas de microalgas comprenden aminoácidos esenciales, específicamente lisina y aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), isoleucina y valina, que representan el 35% de los aminoácidos esenciales en las proteínas musculares humanas. El análisis de composición de las proteínas de microalgas indica claramente que esta proteína de alta calidad puede utilizarse eficazmente como suplementos directos o podría utilizarse para la formulación de otros productos de salud como los nutraceúticos (Brown, Jeffrey, Volkman y Dunstan, 1997).

Recientemente las proteínas derivadas de animales, como carne y productos lácteos han sido muy criticadas por el mercado nutricional debido a las enfermedades de los animales y a la nueva tendencia hacia una dieta vegetariana (Fuhrman & Ferreri, 2010). En este sentido, por su alto valor biológico, las proteínas derivadas de microalgas marinas podrían utilizarse como una fuente alternativa de proteínas para alimentos y productos farmacéuticos (Nasseri, Rasoul-Amini, Morowvat y Ghasemi, 2011). Los carbohidratos en microalgas pueden ser encontrados en forma de almidón, glucosa, azúcares u otros polisacáridos. Su digestibilidad es alta, por lo que

no hay limitación, de uso en preparados alimenticios tanto para animales como para humanos.

Los lípidos en las microalgas están compuestos de glicerol, bases esterificadas de ácidos grasos saturados e insaturados (12 a 22 átomos de carbono). Entre todos los ácidos grasos en microalgas tienen especial interés algunos de las familias $n3$ y $n6$ (ácido eicosapentaenoico, $20:5n3$ o ácido docohexaenoico, $22:6n3$). La cantidad y la relativa proporción de ácidos grasos pueden estar afectadas por factores nutricionales y medioambientales, por ejemplo, la limitación por nitrógeno, estrés producido por un exceso de luz o salinidad que pueden producir un aumento considerable del contenido en ácidos grasos (ejemplo de plasticidad metabólica), (Spolaore y cols., 2006; Becker, 2007).

En las dos últimas décadas evidencias médicas demuestran que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (LC-PUFAs) previene enfermedades cardiovasculares (Shahidi y Miraliakbari, 2004), cáncer (Roynette y cols., 2004), infartos (Hankey y Jamrozik, 1996), diabetes (Seo y cols., 2005), enfermedades inflamatorias o desordenes neuropsiquiátricos (Reddy y Yao, 2003).

Actualmente la fuente comercial de ácidos grasos poliinsaturados es el aceite de pescado, el cual es rico en estas sustancias debido a que los peces se nutren en una proporción elevada de fitoplancton marino que es el organismo que en origen los sintetiza. Desgraciadamente, la mayoría de los aceites de pescado que se producen hoy día se destinan a la producción de margarinas vía hidrogenación (Yongmanitchai y Ward, 1989), por lo que no se satisface la demanda mundial de estos compuestos.

Cabe por tanto pensar en el fitoplancton marino como fuente potencial de ácidos grasos poliinsaturados, cuya principal dificultad estriba en la selección o mutación de la especie adecuada y en el desarrollo de sistemas de cultivo apropiados. Las ventajas de las microalgas como fuente de ácido eicosapentaenoico (EPA) respecto de los aceites de pescado son diversas. En primer lugar, el EPA obtenido a partir de microalgas se encuentra libre de colesterol, del olor propio del pescado, así como de diferentes tóxicos que tienden a acumularse en las grasas del pescado y facilita además una biomasa de composición homogénea lo cual simplifica en mucho los procesos de extracción y purificación posteriores.

1.2.3. Pigmentos procedentes de microalgas

Como organismos fotosintéticos, las microalgas contienen una serie de pigmentos captadores de la luz que suelen encontrarse en bajas concentraciones, si bien, bajo ciertas condiciones fisiológicas, pueden acumularse en la célula alcanzando concentraciones considerables.

Aparte de las clorofilas, los pigmentos más importantes desde el punto de vista comercial son las ficobiliproteínas (pigmentos antena que se encuentran en cianobacterias y algas rojas, como la ficocianina y la ficoeritrina) y los carotenoides (carotenos y xantofilas que actúan en las células como fotoprotectores y pigmentos antena, de los que existen unos 400 diferentes). Sin embargo, solo unos cuantos son utilizados comercialmente, como el β -caroteno, la zeaxantina, la astaxantina, la cantaxantina y la luteína.

β-caroteno:

La microalga *Dunaliella bardawil* (*Dunaliella salina*) puede acumular hasta un 10 % de su peso seco en forma de β-caroteno, lo que la convierte en una potencial fuente de este pigmento (Cohen, 1986).

Su utilización comercial comprende el empleo como colorante alimentario natural, fuente de vitamina A (se trata del precursor de esta vitamina) y como fármaco antioxidante en la prevención del cáncer (Krinsky 2003; Spolaore y cols., 2006).

Astaxantina:

Es un carotenoide de alto valor añadido con aplicaciones en la industria nutraceútica, cosmética y alimentaria. Esta xantofila se encuentra en muchas microalgas en muy bajas cantidades. *Haematococcus pluvialis* es la única microalga que se ha explotado comercialmente para la producción de este pigmento ya que su contenido en él, puede contener hasta un 3 % del peso seco de la biomasa (Olaizola y Huntley, 2003). Este compuesto se utiliza en acuicultura para dar pigmentación a la carne de los peces.

La ingesta de astaxantina, acumulada en elevadas cantidades por la microalga *Haematococcus pluvialis*, resulta efectiva contra el cáncer de mama (Chew y cols., 1999). Los contenidos en astaxantina en diversas especies varían además en función de las condiciones de cultivo; por ejemplo, la limitación de nitrógeno incrementa el contenido en astaxantina

de *Haematococcus pluvialis* (Boussiba y Vonshak, 1991; Del Río et al., 2005). Otros estudios demuestran que la astaxantina natural es un excelente protector solar (interno) protegiendo la piel del daño causado por la exposición a rayos UV, teniendo un gran potencial como suplemento antiedad de belleza y protector de la piel (Capelly y cols., 2012).

Luteína:

El organismo humano no biosintetiza la luteína, por lo que debe ser obtenida a partir de otras fuentes naturales para ser ingerida en la dieta. Estas fuentes naturales pueden ser microalgas, bacterias y plantas superiores, las cuales acumulan luteína como pigmento fotosintético y agente protector frente a la luz solar.

Entre las principales funciones de la luteína se encuentran sus propiedades antioxidantes que protegiendo al organismo de los efectos nocivos de los radicales libres.

A pesar de la amplia distribución de la luteína en plantas superiores y en productos industriales no es hasta hace varias décadas cuando se están realizando esfuerzos para establecer una producción comercial de este pigmento a partir de microalgas. Estos microorganismos constituyen una importante fuente para la producción de carotenoides debido a que pueden ser acumulados en cantidades muy superiores a las de otros organismos fotosintéticos. La generación de estos pigmentos depende de la capacidad bioquímica de la especie de microalga seleccionada.

Las microalgas que han sido referenciadas como potencialmente útiles para esta aplicación por su elevado contenido en luteína son *Muriellopsis* sp., *Chlorella zofi-giensis*, *Chlorella protothecoides* y *Scenedesmus almeriensis* (Shi y cols., 2002; Sánchez- Fernández 2008). La síntesis de luteína está ligada a la generación de biomasa, de forma que las mayores productividades de luteína se alcanzan para las condiciones de cultivo que también maximizan la productividad de biomasa.

1.2.4. Microalgas en alimentación animal.

La biotecnología microbiana ha ganado considerable importancia en las últimas décadas y su uso se está extendiendo día a día en varias áreas como la investigación nutracéutica, la fuente de energía renovable, la producción de biomoléculas esenciales como el β -caroteno, la astaxantina, los PUFAs, la producción de biocolorantes, el tratamiento de aguas residuales, la biorremediación y la acuicultura etc. Entre todas estas, las microalgas como fuente de nutrición han llamado la atención desde hace mucho tiempo y son ampliamente utilizadas en nutrición animal. La harina de pescado es el ingrediente proteico preferido de la alimentación en la industria de la acuicultura, contribuyendo significativamente al costo de producción variable. Sin embargo, la disminución de la oferta de harina de pescado y el aumento de los costos amenazan la sostenibilidad y el crecimiento de la industria acuícola. Por lo tanto, la solución completa o parcial de la harina de pescado con proteínas alternativas es necesaria para resolver el problema. En la actualidad, las microalgas se utilizan en

todo el mundo como una fuente alternativa de proteínas que sustituye la harina de pescado con éxito. En los ensayos de alimentación con peces, se ha descubierto que muchos tipos de microalgas se usan para aumentar el crecimiento (acreción de proteínas), la utilización de alimentos, la actividad fisiológica, la respuesta al estrés, la tolerancia al hambre, la resistencia a las enfermedades y la calidad de la carne.

Las microalgas juegan un papel vital en la cadena alimentaria acuática y se usan popularmente en la cría de animales acuáticos como moluscos, camarones y peces en diferentes etapas de crecimiento (Borowitzka 1998).

Las microalgas se usan comúnmente en la crianza de larvas de peces marinos. Se añaden directamente al agua en los tanques de cría, cuando se aplica la técnica de "agua verde" (Reitan y cols., 1997), o se utilizan como alimento para rotíferos. La adición de microalgas a menudo tiene un efecto positivo en las tasas de supervivencia de las larvas de peces (Oie y cols., 1997) y en la composición de especies de la microbiota intestinal de las larvas al disminuir el número de bacterias oportunistas (Salvesen y cols., 1999). En cultivos rotíferos, el uso de microalgas conduce a una disminución del número de bacterias asociadas con los rotíferos, en comparación con los cultivos alimentados con dietas basadas en levaduras (Oie y cols., 1994).

En la mayoría de los casos, todas las algas se utilizan como alimento o suplemento alimenticio. Los datos sobre la composición química de algas dan la información básica sobre el potencial nutritivo de la biomasa de algas

(Brown y cols., 1997). La popularidad de las microalgas como pienso de acuicultura está aumentando día a día debido a su tamaño adecuado, alto valor nutricional, alta tasa de crecimiento, propiedad antioxidante, poder de resistencia a enfermedades, etc. El valor nutricional de las microalgas está influenciado por su tamaño, forma, digestibilidad y composiciones bioquímicas (Brown y cols., 1997). Se utilizan como nutrientes básicos y como fuente de pigmentos para colorear la piel. Por lo tanto, diversas composiciones químicas de varias microalgas han sido determinadas por varios autores para revelar su valor nutricional para usarlas con éxito como alimento acuícola.

Las microalgas no son solamente consideradas como fuentes esenciales de alimentación en acuicultura, sino que también juegan un papel importante en el incremento de la calidad de las especies animales cultivadas. El contenido en aminoácidos, ácidos grasos, así como otras biomoléculas, influye de forma determinante en el desarrollo de larvas y bivalvos.

Hoy en día existen más de 40 especies diferentes utilizadas en acuicultura, en la tabla 3, detallamos el perfil bioquímico de las cepas marinas destinadas a acuicultura con mayor contenido proteínico y lipídico.

Las algas vivas también mejoran la calidad del agua, son el punto de inicio biológico en el flujo de energía a través de las cadenas alimentarias acuáticas, su presencia influye en el contenido de O₂ y CO₂ del medio, afectando de forma directa al crecimiento de la fauna de los ecosistemas acuáticos.

Tabla 3. Perfil bioquímico de las cepas marinas destinadas a acuicultura con mayor contenido proteínico y lipídico.

Especie de microalga	Proteínas, %	Carbohidratos, %	Lípidos, %
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	34	6,0	16
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	34	8,8	19
<i>Isochrysis aff. galbana</i> (T-ISO)	23	6,0	20
<i>Nannochloropsis</i> sp.	40	20,0	27
<i>Pavlova lutheri</i>	29	9,0	12

Richmond y cols. (2010).

Investigadores han mostrado que la adición de microalgas (*Schizochytrium* sp.) en dietas de vacas lecheras o cabras contribuyó por un lado a un incremento de los niveles de DHA y ácido linoleico, reduciéndose por tanto los ácidos grasos saturados en vacas y, por otro lado, que la adicción de esta cepa en el alimento a cabras se traduce en el aumento de niveles de DHA y EPA en la leche y también en el yogurt o queso feta (Papadopoulos y cols., 2002).

Diversos estudios han mostrado cómo la incorporación de *Spirulina platensis* en dietas para conejos reduce los niveles de colesterol en el suero de la sangre de animales e incrementa el colesterol lipoproteínico. En otro estudio relativo a conejos adultos, encontraron que la incorporación de *S. platensis* en la dieta incrementó la digestibilidad de la proteína cruda. Además, se ha estudiado que el consumo de algas ricas en ácidos grasos poliinsaturados enriquece la carne con esos mismos ácidos grasos. A su vez, las microalgas *S. platensis* y *Schizochytrium* sp. han sido utilizada

como un suplemento proteico y suplemento de DHA (en la dieta para cerdos).

Por otro lado, la alimentación de *Chlorella* en un porcentaje de un 2 y 10 % en gallinas condujo a un aumento del ácido linolénico y DHA en la yema de huevo, con una simultánea reducción del ácido docosatetraenoico, en especial cuando la cantidad de algas añadidas a la alimentación excedía del 10 %. Además, la adición de *Spirulina* en la dieta de las gallinas ponedoras mejoró el color de la yema de huevo.

Las microalgas son el objeto de interés de las grandes empresas del sector alimentario. Actualmente en España podemos encontrar alguna que otra empresa reciente sobre microalgas en vías de producción, entre ellas podemos citar Easy algae, Algae-nergy o Aqualgae (EBT) para acuicultura o Cleanalgae también para el mercado de la acuicultura o incluso empiezan en el mercado de la cosmética, nutrición, farmacéutica o bioenergía. Por otro lado, solo en España se implementan más de un centenar de proyectos de desarrollo tecnológico basados, en microalgas y más de una decena de grandes proyectos de construcción de plantas de cultivo.

1.2.5. Microalgas y contaminación del medio acuático.

El medio acuático y en especial el marino es uno de los ambientes más expuestos a los contaminantes, debido a que las descargas, sean por vía terrestre, acuático-terrestre o atmosférica, tienen como receptáculo final el ambiente marino (Acuña-González y cols., 2004, Coll y cols. 2004, García-Céspedes y cols. 2004.). En estos sistemas las microalgas

constituyen el principal componente del fitoplancton que soporta la cadena trófica, de esta manera, un cambio, sea cualitativo o cuantitativo, producido por un contaminante, podría repercutir drásticamente en el ecosistema (Franklin y cols. 2000).

A concentraciones bajas, muchos de los metales juegan un papel esencial en el metabolismo de las microalgas, tal es el caso de los metales Zn y Cu (Tadros y cols. 1990); sin embargo, cuando las concentraciones son altas, dan origen a condiciones de contaminación del medio que provocan desbalances metabólicos en el fitoplancton (Rodríguez y Rivera 1995). Por ejemplo, cuando el fitoplancton es expuesto a concentraciones elevadas de metales pesados, se produce una inhibición del crecimiento, así como cambios morfológicos, generados como una respuesta fisiológica a la exposición del metal que tienen como consecuencia una menor capacidad de respuesta de las poblaciones al ambiente (Rand y Petrocelli 1985, Walsh y cols. 1987, Visviki y Rachlin 1994).

Algunas microalgas de zonas templadas han sido consideradas como especies modelos para estudiar efectos de contaminación, debido a su sensibilidad ante diversos materiales de prueba, poseer una alta tasa de crecimiento y de ser cultivadas fácilmente en el laboratorio (Couture y cols. 1985).

Concretamente la *Tetraselmis chuii*, debido a su gran distribución en los ecosistemas tropicales y amplia utilización en cultivos de laboratorios, le confiere una importancia notable como una posible especie modelo para estimar el impacto ambiental producido por xenobióticos.

1.2.6. Microalgas y péptidos bioactivos

Las algas marinas están ampliamente presentes en la dieta humana asiática, y se ha encontrado que tiene beneficios para la salud y las enfermedades crónicas, como las enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes, de acuerdo a los estudios observacionales en el Sudeste Asiático. En este sentido, los organismos marinos producen una variedad de moléculas bioactivas, que pueden desarrollarse como nutracéuticos y fármacos para la suplementación de la nutrición humana y la terapia de enfermedades (Browlee y cols., 2011).

Las algas marinas incluyen microalgas unicelulares y macroalgas multicelulares. Como se comentó anteriormente, en las algas marinas existe un alto contenido de proteínas, generalmente del 5 al 15% del peso seco en las algas marrones y del 10 al 47% del peso seco en las algas rojas y verdes. Recientemente, existe un enorme interés en utilizar la proteína de algas marinas como fuente de péptidos bioactivos (Dettmar y cols., 2011). Dependiendo de la secuencia de aminoácidos, los péptidos derivados de algas marinas pueden estar implicados en diversas funciones biológicas, incluyendo efectos antioxidantes, anticancerígenos, antihipertensivos, antiateroscleróticos e inmunomoduladores.

1.2.6.1. Biopeptidos antioxidantes: Existen varias especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como radicales peroxilo (ROO^\cdot), radicales de óxido nítrico (NO^\cdot), radicales hidroxilo (OH^\cdot) y radicales superóxido (O_2^\cdot). La acumulación ilimitada de ERO puede conducir a muchos trastornos de

salud como el cáncer, la diabetes mellitus, el envejecimiento, la hipertensión y las enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias (Valko y cols., 2007). El uso de antioxidantes sintéticos como el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT) y la terc-butilhidroquinona (TBHQ) en los seres humanos está asociado con algunos efectos secundarios, como la carcinogénesis y el daño hepático (Lindenschmidt y cols., 1986). Por lo tanto, es importante buscar antioxidantes seguros y naturales para la protección contra los trastornos de salud inducidos por ERO.

En el océano, el ambiente extremo, como la baja intensidad de la luz y altas concentraciones de oxígeno, conduce a la formación de radicales libres y otros ERO en las células. Por lo tanto, para la autoprotección contra daños oxidativos graves, las algas marinas podrían producir antioxidantes potentes (Guedes y cols., 2011). De hecho, las algas marinas han sido consideradas como una rica fuente de antioxidantes naturales debido a la presencia de diversos metabolitos secundarios con efecto antioxidante. (Ngo y cols., 2011). Especialmente, se han investigado las actividades antioxidantes de algunos hidrolizados de proteínas o péptidos de algas marinas. Los extractos de proteasa de las algas marinas *Scytosiphon Lomentaria* e *Ishige Okamurae* mostraron actividades de alta magnitud. (Ahn y cols., 2004 y Heo y cols. 2008).

Sin embargo, estas actividades antioxidantes de péptidos derivados de algas marinas se basan en un ensayo in vitro; se desconoce si las actividades antioxidantes in vitro son consistentes con sus actividades in vivo.

1.2.6.2. Biopeptidos anticancer: el cáncer es una amenaza continuamente creciente para la salud humana. La radioterapia y la quimioterapia son los principales enfoques para combatir el cáncer, a pesar de la presencia de efectos secundarios y el desarrollo de resistencia. Se ha demostrado que los péptidos derivados de algas marinas poseen efectos citotóxicos en células cancerosas humanas (Kang y cols., 2013). Por ejemplo, a partir de residuos de proteína de *Chlorella Vulgaris*, Sheih y cols. aislaron un undecapéptido con la secuencia VECYGPNRPF, que exhibía un fuerte efecto de antiproliferación celular dependiente de la dosis.

Estos resultados revelan que el uso de péptidos de algas marinas tiene potencial para la prevención y el tratamiento del cáncer, pero sus mecanismos de acción necesitan ser ampliamente elucidados. Generalmente, los péptidos anticancerosos marinos destruyen las células cancerosas mediante diferentes mecanismos, incluyendo la inducción de la apoptosis, el desequilibrio tubulina-microtúbulos y la inhibición de la angiogénesis (Zheng y cols., 2011). La apoptosis, como una forma de muerte celular programada, se produce principalmente a través de dos vías bien caracterizadas iniciadas por la activación de caspasas en las células: una es la vía del receptor de muerte extrínseca y otra es la vía mitocondrial intrínseca (Gupta y cols., 2009). Se informó que muchos péptidos originados de animales marinos adoptaban una estrategia de desencadenamiento de procesos apoptóticos (Zheng y cols., 2013), lo cual debería ser útil para demostrar el mecanismo detallado de acción de los péptidos derivados de algas marinas.

1.2.6.3. Biopeptidos antihipertensión: la hipertensión se reconoce como un objetivo clave para el control de la mortalidad relacionada con la enfermedad cardiovascular (Verdecchia y cols., 2008). Ha habido un interés continuo en la búsqueda de péptidos bioactivos con propiedades antihipertensivas de algas marinas. De la *Undaria Pinnatifida*, Suetsuna y cols. caracterizaron 10 tipos de dipéptidos; entre ellos, cuatro péptidos (YH, KY, FY e IY) disminuyeron significativamente la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas. Cha y cols. informaron que cinco diferentes digestiones enzimáticas de un alga marina *Ecklonia Cava* mostraron potentes efectos inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) con valores de IC50 de 2,33 a 3,56 µg / mL.

Por lo tanto, los péptidos ricos en arginina también pueden ser considerados como una estrategia para la terapia de hipertensión (Udenigwe y Mohan, 2014).

1.2.6.4. Biopeptidos antiaterosclerosis: La aterogénesis es un proceso por el cual las placas se forman gradualmente por los materiales grasos, que pueden conducir a la tensión arterial alta y a la enfermedad cardiovascular como resultado de arterias comprometidas. Un estudio reciente (Shih y cols., 2013), mostró que un undecapéptido de *Chlorella*, con la secuencia amino VECYGNRPQF, suprimió significativamente los niveles de E-selectina, molécula de adhesión celular intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), y la expresión de genes endotelina-1 (ET-1). Por otro lado, el papel inflamatorio vascular del factor activador de las plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH) se considera un

objetivo terapéutico prometedor para la prevención del aterosclerosis. Se aislaron y caracterizaron varios oligopéptidos de la macroalga roja *Palmaria Palmata*. (Fitzgerald y cols., 2013).

Los estudios sugieren que los efectos antiaterosclerosis de los péptidos derivados de algas marinas podrían estar asociados con la reducción de la molécula de adhesión, la inhibición de la acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas y la antiinflamación.

1.2.6.5. Biopeptidos Inmunomoduladores: en ratones Balb / c desnutridos, Morris y cols. informaron que la administración oral de hidrolizado de proteína de *Chlorella vulgaris* activa tanto las respuestas inmunes innatas como las específicas, incluyendo el aumento marcado de linfocitos, la producción de respuestas de anticuerpos dependientes de células T y la reconstitución de reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH). En otro estudio (Ahn y cols., 2008), se demostró que el hidrolizado de *Ecklonia Cava* tenía efecto inmunoestimulante sobre esplenocitos murinos in vitro. Adicionalmente, en ratones ICR tratados con hidrolizado de E. Cava, la proliferación de esplenocitos se incrementó dramáticamente; los números de células T CD4 +, células T CD8 + y células CD45R / B220 + B aumentaron notablemente; el TNF- α y el IFN- γ fueron regulados negativamente, e IL-4 y IL-10 fueron reguladas positivamente.

Las observaciones anteriores sugieren que el mecanismo inmunomodulador de proteínas o péptidos derivados de algas marinas está implicado principalmente en la regulación de citoquinas y en las vías de proliferación de células T y células B.

1.3. TETRASELMIS CHUII

Tetraselmis chuii es una microalga marina unicelular y móvil, de 10 a 15 µm de tamaño, con forma elipsoidal que se reproduce por fisión longitudinal.

La clasificación taxonómica de la microalga *Tetraselmis chuii* (Butcher, 1959) es la siguiente:

Reino *Plantae*

Phylum *Chlorophyta*

Clase *Prasinophyceae*

Orden *Chlorodendrales*

Familia *Chlorodendraceae*

Género *Tetraselmis*

Tetraselmis chuii fue aislada por primera vez en los años 50 en las costas de Gran Bretaña (Butcher, 1959) y posteriormente ha sido aislada en diferentes partes del mundo, incluida la bahía de Cádiz. Está identificada con el número 8/6 en la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) del Reino Unido.

1.3.1. Análisis de composición

La microalga *Tetraselmis chuii* presenta un alto contenido en proteínas, hidratos de carbono y minerales (Tabla 4). Las proteínas contienen ácido glutámico, ácido aspártico y leucina como aminoácidos más abundantes, y todos los aminoácidos esenciales. No se aportan datos de asparagina, glutamina, prolina y cisteína. El calcio es el elemento más abundante en el liofilizado dentro del grupo de los minerales, siendo también abundantes los cloruros y el sodio. Las grasas representan el 6,7 % del liofilizado, y aproximadamente el 50 % de los PUFAs, siendo el ácido linolénico el más abundante.

Tabla 4. Resultados del análisis de composición de tres lotes del liofilizado de *Tetraselmis chuii* procedente de la producción industrial de la empresa Fitoplacton Marino S.L. (media de tres lotes \pm desviación estándar).

Determinación	Resultado
Humedad (%)	6,3 \pm 0,02
Proteínas (%)	37,6 \pm 0,40
Cenizas (%)	15,5 \pm 0,05
Hidratos de carbono (%)	31,6 \pm 0,38
Fibra alimentaria (%)	2,3 \pm 0,00
Grasas (%)	6,7 \pm 0,25
Kcal/100 g	337 \pm 1,35
Kjulios/100 g	1 408 \pm 5,66

Tabla 5. Aminograma (% de proteínas). Resultados del análisis de composición de tres lotes del liofilizado de *Tetraselmis chuii* procedente de la producción industrial de la empresa Fitoplacton Marino S.L. (media de tres lotes \pm desviación estándar).

Determinación	Resultado
Valina	2,27 \pm 0,12
Triptófano	0,61 \pm 0,01
Treonina	1,81 \pm 0,13
Tirosina	1,38 \pm 0,15
Serina	1,63 \pm 0,09
Metionina	0,87 \pm 0,12
Lisina	2,03 \pm 0,15
Leucina	3,08 \pm 0,09
Isoleucina	1,57 \pm 0,11
Histidina	0,65 \pm 0,13
Glicina	2,25 \pm 0,14
Fenilalanina	1,95 \pm 0,07
Arginina	2,66 \pm 0,09
Alanina	2,79 \pm 0,17
Ac. Glutámico	4,67 \pm 0,12

Tabla 6. Minerales (mg/g). Resultados del análisis de composición de tres lotes del liofilizado de *Tetraselmis chuii* procedente de la producción industrial de la empresa Fitoplacton Marino S.L. (media de tres lotes \pm desviación estándar).

Determinación	Resultado
Calcio	33,80 \pm 0,26
Magnesio	5,06 \pm 0,09
Hierro	2,01 \pm 0,04
Fósforo	6,27 \pm 1,87
Sodio	14,33 \pm 4,16
Potasio	10,40 \pm 0,56
Cloruros	17,77 \pm 0,25
Cobre	0,006 \pm 0,00
Yodo (mg/kg)	5,03 \pm 5,78

Tabla 7. Ácidos grasos (% de grasa). Resultados del análisis de composición de tres lotes del liofilizado de *Tetraselmis chuii* procedente de la producción industrial de la empresa Fitoplacton Marino S.L. (media de tres lotes \pm desviación estándar).

Determinación	Resultado
Saturados	30,27 \pm 0,50
Monoinsaturados	22,97 \pm 0,90
Poliinsaturados	46,77 \pm 1,36

1.3.2. Descripción del proceso de producción (Proporcionado por Fitoplancton Marino S.L).

Para obtener la cantidad necesaria de *Tetraselmis chuii*, y poder realizar el presente estudio, la empresa Fitoplancton Marino S.L, nos proporciona la microalga y su proceso de producción.

El proceso de producción, consta de cuatro etapas: cultivo, cosechado, liofilizado y envasado.

1. Cultivo

- Obtención del inóculo. La cepa procedente de la colección de algas del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN-CSIC) se cultiva a temperatura, atmosfera de CO₂ y horas de luz controladas. Cuando el volumen del cultivo se ha incrementando convenientemente se incorpora a los fotobioreactores para su obtención a escala industrial.
- Producción industrial. Se utilizan dos tipos de fotobioreactores, de inoculación y de producción, situados ambos en el exterior. Son sistemas cerrados, aislados del ambiente exterior para evitar contaminaciones. Están formados por tanques y tubos transparentes en cuyo interior el cultivo se desarrolla a la temperatura y luz ambiental. Cuando en los fotobioreactores de inóculo se ha conseguido un cultivo denso de microalgas, se trasvasa, de forma automatizada y a través de tuberías cerradas, a los fotobioreactores

de producción en los cuales, una vez alcanzada la densidad celular deseada, se realiza el cosechado de la microalga.

- Para el cultivo se utiliza agua de mar estéril, tras análisis fisicoquímico, microbiológico, de metales pesados y de plaguicidas. Los análisis corresponden a tres muestras de agua recogidas a lo largo de 1 año. Para mantener el cultivo en condiciones óptimas la cepa es renovada cada 15 días y dos veces al año se renueva a partir de la colección de algas del ICMAN-CSIC. De igual forma, asegura que para mantener constantes las características nutricionales de la cepa se controla diariamente la concentración de nutrientes en el cultivo, así como todos los parámetros críticos para garantizar la reproducibilidad del proceso.

2. Cosechado.

El cosechado se realiza centrifugando el cultivo a 4 °C. La pasta obtenida es recogida en bolsas de plástico para su posterior liofilización.

3. Liofilizado.

El proceso del liofilizado se realiza a una temperatura no superior a 30 °C, obteniéndose unas tortas de algas deshidratadas.

4. Envasado.

Cada lote de tortas de algas deshidratadas es triturado a temperatura controlada y envasado al vacío en volúmenes de 250 g/bolsa. Las bolsas

se guardan en los almacenes de la empresa a una temperatura constante de 20 °C.

La microalga *Tetraselmis chuii* tiene un uso extenso en el cultivo de crustáceos, moluscos y como eslabón primario en la cadena alimentaria de larvas de peces que, como la dorada, son criados en piscifactorías. Por todo ello, aunque no existen referencias sobre su consumo directo en humanos, la especie *Tetraselmis chuii* está introducida de forma indirecta en la cadena alimentaria humana.

AESAN, en septiembre de 2013, acepta la tetraselmis chuii como nuevo alimento y consumo en humanos y en 2016 se patenta TetraSOD®, comprimidos de liofilizado de tetraselmis chuii.

Tabla 8. % del perfil de A.G. TetraSOD®

Perfiles de los A.G	%
16:0 Palmítico	26%
18:1-ω9 Oleico	18%
18:2-ω6 Linoleico	4%
18:3-ω3 alfa-linoleico	19%
20:5-ω3 EPA	13%
Otros	20%

Fitoplancton Marino S.L

Tabla 9. SOD TetraSOD®

	Unidades
ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno)	34.300 μmol TE/100g
Actividad SOD	30.000 U/g

Fitoplancton Marino S.L

Tabla 10. Vitaminas de TetraSOD®

VITAMINAS	Por cada 100g de producto
<i>B1</i>	<i>1.04 mg</i>
<i>B2</i>	<i>0.72 mg</i>
<i>B6</i>	<i>1.20 mg</i>
<i>B12</i>	<i>230.3µg</i>
<i>E</i>	<i>52.0 mg</i>
<i>C</i>	<i>333.3 mg</i>

Fitoplancton Marino S.L

Dado la presencia en esta microalga de cantidades importantes de SOD y las importantes concentraciones de vitaminas E y C, nuestra hipótesis sería que, al tomar una suplementación de esta microalga, podría producir en el individuo unos menores niveles de estrés oxidativo y con ello una mejora en su rendimiento deportivo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

A raíz de la revisión bibliográfica acerca de la situación científica actual relacionada con el estrés oxidativo en el deporte, microalgas y la microalga *tetraselmis chuii*, se plantean los siguientes objetivos:

- 1- Valorar los efectos de la toma de la microalga *tetraselmis chuii* durante 1 mes sobre los parámetros ergoespirométricos de deportistas.
- 2- Valorar los efectos de la toma sobre el hemograma de los deportistas.
- 3- Valorar las modificaciones que puede producir la toma en diferentes parámetros bioquímicos.
- 4- Evaluación del efecto que tiene la toma sobre el posible estrés oxidativo de los deportistas.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS UTILIZADOS

El material utilizado detallado a continuación es perteneciente al laboratorio de Fisiología de la Facultad de Ciencias del Deporte de la Universidad de Extremadura.

En las tablas 11,12,13 y 14 se detallan las características de los reactivos utilizados:

Tabla 11. Reactivos genéricos utilizados.

Reactivo	Fabricante	Ciudad
Agua destilada	Dpto. Fisiología	Cáceres
Agua Mil Q	Dpto. Fisiología	Cáceres
Metaphosphoric acid	Sigma	Madrid
Perchloric acid 70%	Panreac	Barcelona

Tabla 12. Reactivos utilizados en la valoración del estrés oxidativo.

Reactivo	Fabricante	Ciudad
1-Butanol	Sigma	Madrid
Butylated hydroxytoluene	Sigma	Madrid
Methanol absolute	Scharlau	Barcelona
Potassium dihydrogen phosphate	Fluka chemika	Buchs (Suiza)

Tabla 13. Reactivos utilizados en la determinación de la respuesta antioxidante.

Reactivo	Fabricante	Ciudad
Alpha tocopherol acetate	Sigma	Madrid
Ascorbic acid	Sigma	Madrid
Dichloromethane	Sigma	Madrid
Ethanol absolute	Scharlau	Barcelona
Methanol absolute	Scharlau	Barcelona
N- hexane 96%	Scharlau	Barcelona
Nitrógeno comprimido	AirLiquide	Madrid

Tabla 14. Reactivos utilizados para la valoración de los ácidos grasos.

Material	Fabricante	Ciudad
Metanol Benceno (4:1)	Panreac. S.L.	Barcelona
Acetilclorhídrico	Scharlau. S.L.	Sentmenat
K ₂ CO ₂ al 6%	Panreac. S.L.	Barcelona

3.2. MATERIAL UTILIZADO

En las tablas 15,16,17,18,19 y 20 se presenta el instrumental utilizado:

Tabla 15. Material utilizado en la valoración médica y la valoración del rendimiento.

Material	Modelo	Fabricante	Ciudad
Analizador de gases	Metamax	Cortex	Alemania
Tapiz rodante	Ergofit 4000	Powerjog	Alemania
Electrocardiógrafo	BTL 08 SD6	BTL	República Checa
Esfingonamómetro	Aneroide	Corysan	Barcelona
Fonendoscopio	Clasic II S.E	3M Littmann	Madrid
Interface pulsómetro	Advantage interface	POLAR	Finlandia
PC Intel core 15	Software Windows 10		
Pulsómetro	S720 i	POLAR	Finlandia
Software analizador de gases	Metamax	Cortex	Alemania
Software pulsómetro	Precision Performance	POLAR	Finlandia

Tabla 16. Material utilizado en la valoración antropométrica.

Material	Modelo	Fabricante	Ciudad
Báscula de pesaje y tallímetro	Seca 225	SECA	Alemania
Cinta métrica	Seca 201	SECA	Alemania
Paquímetro	Bycondilar caliper	Holtain	Crymych (UK)
Plicómetro	Skinfold caliper	Holtain	Crymych (UK)

Tabla 17. Material genérico utilizado.

Material	Modelo	Fabricante	Ciudad
Balanza de precisión	ADA 120/L	Adam Equipament	Bletchley (UK)
Baño termostático	Raypa	Espinar	Barcelona
Dispensador de agua Mili Q	Quick Serve Tap	Worldwide Dispensers	London (UK)
Esparadrapo	Omniplast	Hastmann	Barcelona
Gradillas portatubos	Eppendorf	P- Selecta	Barcelona
Gradillas cortatubos	Tubos 5/10 ml	P- Selecta	Barcelona
Guantes de latex	Grado médico	Krape	Madrid
Laboratory film	Parafilm	Pechiney	EEUU
Laptop	Satellite	Toshiba	EEUU
Pipetas 100- 1000 µl	Finnpipette F2	Thermo scientific	Madrid
Periféricos informáticos	PSC 1410	Hewlett Packard	Madrid
Puntas de plástico para pipetas	5- 1000 µL	Detalab	Barcelona
Termostato de bloque para tubos	Multiplaces	P- Selecta	Barcelona
Termómetro- medidor de humedad- presión atmosférica	Huger	HomFor	Alemania
Tubos eppendorf (1-2 mL)	Microcentrifuge tubes	Eppendorf	Alemania
Vortex (agitador vibrador)	Heidolph	Reax	Alemania

Tabla 18. Material utilizado en la recogida y tratamiento de las muestras.

Material	Modelo	Fabricante	Ciudad
Algodón	Enrollado	Texpol	Barcelona
Capilares	25 µL NA- Hp	Brand	Alemania
Centrifuga digital	Meditronic	P- Selecta	Barcelona
Compresor de goma	Ri- clip	Riester	EEUU
Congelador	Horizontal	Lynx	Zaragoza
Gasas esterilizadas	Lusan	Hartmann	Barcelona
Microcentrifugadora	Microcen	OrtoAlresa	Madrid
Microcentrifugadora	Biofuge pico	Heraus	Madrid
Probetas de vidrio	DIN 12 680	Marienfeld	Alemania
Tubos EDTA para extracción de sangre de 5 mL	Valcutainer	Becton Dickinson	Madrid

Tabla 19. Material utilizado en el análisis de las muestras.

Material	Modelo	Fabricante	Ciudad
Analizador de lactato	YSI 1500 Sport	YSI Inc.	Ohio (EEUU)
Columna HPLC	C18 150 x 4,7 mm	Thermo scientific	Madrid
Columna HPLC	Hypersil Gold 250 x 4,6 mm	Thermo scientific	Madrid
Columna HPLC	Hypersil Ods 150 x 4,6 mm	Thermo scientific	Madrid
Coulter	6706319	Electronics LTD	Luton (England)
HPLC	P100- UV100	Thermofisher scientific	Madrid
HPLC	Waters 996	Waters Inc.	Milford (EEUU)
Software cromatografía	Chrom- Card	Thermofisher scientific	Madrid
Software cromatografía	Clarity Lite	DataApex	Praga (Rep. Checa)
Software cromatografía	Millenium	Waters Inc.	Milford (EEUU)

Tabla 20. Material utilizado para la valoración de los ácidos grasos.

Material	Modelo	Fabricante	Ciudad
Cromatógrafo de gases	HP- 5890	Hewlett Packard.	EEUU
Espectrómetro de masas	HP-5972	Hewlett Packard.	EEUU
Columna Capilar	OMEGAWAX-320 de m. x I.D. mm. x 0.25 m Film.	SGE International Pty Ltd.	Australia

3.3. SUJETOS DE ESTUDIO

La muestra participante en el estudio estaba compuesta por un total de 32 jugadores de Fútbol pertenecientes al Diocesano CF, 16 participaban en la división de Honor de Juveniles (máximo nivel nacional), formando el grupo de suplementación (GS) y 16 participaban en la liga regional extremeña, siendo el grupo control (GC). Todos ellos, tenían una carga semanal de 8 horas de entrenamiento, de volumen e intensidad similar.

Todos los sujetos del estudio fueron informados del mismo y aceptaron su participación voluntaria mediante la firma de un informe consentido, al amparo de las directrices éticas dictadas en la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (actualizadas en la Asamblea Médica Mundial de Seúl 2008), para la investigación con seres humanos.

Los criterios de inclusión, detallados en el cuestionario inicial, que se tuvieron en cuenta para la selección de la muestra fueron los siguientes:

- Que fueran futbolistas masculinos.
- Que pertenecieran a la categoría juvenil.

- Que llevaran 4 años como mínimo entrenando.
- Que entrenasen habitualmente y compitieran durante todo el periodo de estudio.

Los criterios de exclusión que se tuvieron en cuenta fueron:

- Que presentasen algún problema médico, en especial cardiorespiratorio.
- Que fuesen fumadores.
- Que realizaran programas de suplementación nutricional.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo se basa en un estudio experimental en el que los jugadores del GS tomaron durante un mes un comprimido diario de la sustancia de estudio, sin cambiar ninguna de las actividades diarias que realizaban ni sus hábitos nutricionales y el GC no tomarón nada. Se analizaron las siguientes variables antes del inicio de la toma y el día siguiente a la última toma.

Las variables ergoespirométricas, que se registran en el umbral aeróbico, umbral anaeróbico, al final del esfuerzo y tras tres minutos de recueparación:

- Velocidad (Km/h).
- FC en el umbral anaeróbico (ppm).
- Ventilación máxima pulmonar (VE, L/min).

- Volumen de dióxido de carbono (CO_2 , mL/min).
- Volumen de oxígeno (VO_2 , mL/ min).
- Consumo máximo de oxígeno relativo (VO_2 máx, mL/min/kg).
- Cociente respiratorio (CR).
- Equivalente de oxígeno (EqO_2 ; unidades convencionales).
- Equivalente de dióxido de carbono (Eq CO_2 ; unidades convencionales).
- Frecuencia cardíaca (FC, ppm).
- Pulso de oxígeno (Pulso O_2 , ppm/L/min).

Variables Hematológicas:

- Hematocrito (%).
- Hemoglobina (g/dL).
- Hematíes (millones).
- VCM (fL)
- HCM (Pg).
- Plaquetas (miles).
- VPM (fl).
- Leucocitos (miles).
- Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$).

- Monocitos ($10^3/\mu\text{L}$).
- Basófilos ($10^3/\mu\text{L}$).
- Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$).
- VSG (mm).

Variables Bioquímicas:

- Glucosa (mg/dL).
- Colesterol T. (mg/dL).
- Triglicéridos (mg/ dL).
- Ac. Úrico (mg/ dL).
- HDL-colesterol (mg/ dL).
- LDL-colesterol (mg/ dL).
- GOT (U/l).
- GPT (U/l).
- GGT (U/l).
- Creatinina (mg/dl).

Variables de estrés oxidativo y respuesta antioxidante:

- Vitamina A ($\mu\text{g/mL}$).
- Vitamina E ($\mu\text{g/mL}$).

Índices de peroxidación lipídica:

- PEROX1
- PEROX2
- PEROX3
- PEROX4
- PEROX5
- PEROX6
- PEROX7
- PEROX8
- PEROX9
- PEROX10

Variables ácidos grasos:

- 12:0 (%)
- 14:0 (%)
- 14:1 (%)
- 16:0 (%)
- 16:1 (%)
- 18:0 (%)

- 18:1 (%)
- 18: 1.T (%)
- 18:2 n6 (%)
- 18:3 n6 (%)
- 18:3 n3 (%)
- 20:0 (%)
- 20:3 n6 (%)
- 20:4 n6 (%)
- 20:5 n3 (%)
- 22:5 n3 (%)
- 24:0 (%)
- 22:6 n3(%)
- 24:1 (%)
- SAT
- MIN
- POLI n6
- POLI n3
- n6/n3

3.5. PROTOCOLOS DE VALORACIÓN

3.5.1. Valoración de la composición corporal

La composición corporal fue calculada según las indicaciones del grupo español de cineantropometría mediante la utilización de somatocarta para definir los somatotipos referentes a los participantes.

El porcentaje graso fue calculado mediante la ecuación de Yuhasz.

$$\% \text{ Graso: } 3,64 + (\text{suma } 6 \text{ pliegues cutáneos} \times 0,097)$$

Los pliegues cutáneos se determinaron con el uso del plicómetro en el hemisferio dominante de los sujetos:

Abdominal. A la derecha de la cicatriz umbilical, en sentido vertical.

Suprailíaco. Ubicado en el punto de corte formado por la línea del borde superior del íleon y una línea que uniría la espina iliaca antero-superior con el borde axilar anterior. El pliegue se tomó medialmente hacia abajo formando un ángulo de 45° con la horizontal.

Tricipital. Ubicado en la parte posterior del brazo, en el tercio medio. La dirección del pliegue es vertical.

Subescapular. Situado justo debajo del pico inferior de la escápula en dirección oblicua hacia abajo y afuera, con una angulación de 45° respecto a la horizontal.

Muslo. Tomado en la parte anterior del muslo, a la mitad del segmento en dirección vertical, con el sujeto sentado con una flexión de rodilla de 90° y los pies apoyados en el suelo.

Pierna. Tomado en la parte medial de la pierna donde ésta alcanza su máxima circunferencia. El pliegue tendrá una dirección vertical.

Con ellos se obtuvieron dos sumatorios:

$$\Sigma 4 = \text{abdominal} + \text{suprailiaco} + \text{tricipital} + \text{subescapular}$$

$$\Sigma 6 = \Sigma 4 + \text{muslo} + \text{pierna}$$

El porcentaje óseo se calculó a partir del peso óseo, utilizando la ecuación de Von Döbelen y Rocha.

$$\text{Peso Óseo} = 3,02x (\text{Talla}^2 \times \text{D. Biestiloideo} \times \text{D. Bicondiloideo (fémur)} \times 400)^{0,712}$$

Los diámetros se determinaron en el hemisferio dominante de los sujetos del siguiente modo:

Diámetro Bicondiloideo del fémur: distancia entre el cóndilo medial y lateral del fémur. Las ramas del paquímetro ubicadas hacia abajo y en la bisectriz del ángulo formado por la rodilla, en este caso 90°.

Diámetro Biestiloideo: distancia entre las apófisis estiloides del radio y cúbito. Las ramas del paquímetro ubicadas hacia abajo y en la bisectriz del ángulo formado por la muñeca, en este caso 90°.

Diámetro bicondíleo del húmero: distancia entre el epicóndilo y la epitroclea del húmero. Las ramas del paquímetro ubicadas hacia arriba y en la bisectriz del ángulo formado por el codo, en este caso 90°. La medida es algo oblicua, debido a que la epitroclea suele estar en un plano algo inferior al epicóndilo.

El porcentaje residual fue determinado mediante la ecuación de Wurch, que lo considera un valor constante de 24,1 % para hombres, lo que hace que todos tengan el mismo y la desviación estándar sea igual a cero.

El porcentaje muscular fue determinado a partir del cálculo del peso muscular, que se determinó mediante la diferencia entre el peso total y el resto de pesos: óseo, residual y grasa.

Peso muscular: Peso corporal – (peso óseo + peso residual + peso grasa)

3.5.2. Protocolo de esfuerzo

Los sujetos eran citados con suficiente antelación al día de la prueba para someterles a un cuestionario sobre práctica deportiva e informarles de las condiciones en las que debía presentarse a realizar la prueba (no haber entrenado intensamente al menos los dos días anteriores a la prueba y haber hecho una buena carga de hidratos de carbonos durante esos días).

Además, se firmaba el informe consentido y se le entregaba el cuestionario de hábitos alimenticios para que lo cumplimentasen durante

los tres días previos a la prueba, indicándoles las pautas necesarias para poder hacerlo.

El día de la prueba, el sujeto entregaba la encuesta nutricional cumplimentada y se sometía al examen médico (espirometría basal, electrocardiografía, medición de la tensión arterial y auscultación) para descartar problemas cardiorrespiratorios y establecer sus valores basales.

La prueba se realizó en tapiz rodante (Ergofit 4000) realizando protocolo escalonado incremental, con periodo de calentamiento de 8'. Comenzando la prueba a una intensidad de 8 km/h aumentando la carga 1 km/h en cada escalón de 2' hasta los 14 km/h, a partir de aquí se aumenta la intensidad 1 km/h cada 1' hasta llegar al agotamiento.

Al finalizar el protocolo de esfuerzo, los sujetos permanecieron de pie durante 3 minutos, tiempo durante el cual se continuaba registrando los datos cardiorrespiratorios. Éste fue el periodo denominado recuperación.

Ha sido seleccionado este protocolo para su utilización por ser el fútbol un deporte intermitente, con cambios continuos de intensidad y predominar el componente anaeróbico en las demandas exigidas en estos deportistas, por ello el incremento es mayor en la fase anaeróbica.

Todas las pruebas se llevaron a cabo bajo similares condiciones atmosféricas (21- 24° C y 45- 55% de humedad relativa y presión atmosférica comprendida entre 700 y 715 mmHg). Los valores se expresaron en condiciones STPD (Standard Temperature and Pressure Dry).

Señalar, igualmente, que todas las pruebas a lo largo del estudio se realizaron en la misma franja horaria del día a los deportistas para que no se vieran afectados los resultados por los ritmos circadianos.

3.5.3. Protocolo de determinación de umbrales

A la hora de definir los umbrales tenemos que tener en cuenta que son conceptos más teóricos que reales, sin embargo, en la práctica son muy útiles para el ámbito de la investigación y del entrenamiento. Podemos entender los umbrales como barreras de utilización principal de unas fuentes de producción de energía (aeróbicas) frente a otras (anaeróbicas) que en realidad nunca ocurren como un fenómeno de límite o umbral, sino como un proceso de secuencialización. Por tanto, cuando se hace referencia al término umbral aeróbico (en ejercicio incremental y dinámico) se hace referencia a un punto (en el tiempo, intensidad, carga, velocidad, frecuencia cardiaca u otro parámetro que muestre una relación lineal con la intensidad) en el que las fuentes de producción de energía aeróbica dejan de ser principales y comienzan a utilizarse otras fuentes o vías de producción anaeróbicas. La transición aeróbica- anaeróbica es, como su propio nombre indica, la zona en la que las fuentes de producción de energía se mezclan sin que haya predominancia de unas sobre otras. El umbral anaeróbico es el punto en el que la vía de producción de energía es predominantemente anaeróbica (López y cols, 1991).

Así, una vez registrados y extraídos todos los datos se procedió a la determinación de los umbrales ventilatorios según el modelo trifásico de

Skinner y McLellan (1980), que es no invasivo y uno de los más utilizados para la determinación de umbrales ventilatorios (Figura 4).

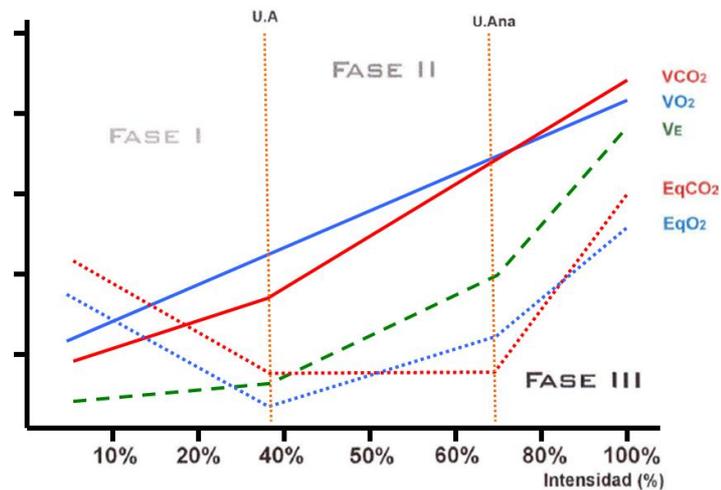


Figura 4. Representación ideal del modelo trifásico de Skinner y McLellan (Modificado de Benito, 2004).

En este modelo se distinguen tres fases, la fase I (aeróbica) que acaba con el umbral aeróbico, donde se observa valores superiores de VO₂ respecto al VCO₂, un primer punto de inflexión del VE y del VCO₂ y una intensidad >40%. Esta primera fase da paso a la fase II o de transición aeróbica- anaeróbica en la que se observa una evolución de los tres parámetros comentados, con una elevación más pronunciada del VCO₂. En esta fase la intensidad estaría entre el 40% y el 70% aproximadamente. Por último, el umbral anaeróbico (70 % de intensidad) da paso a la fase III que es la eminentemente anaeróbica y en la que destaca un segundo punto de inflexión del VE y una elevación del VCO₂ obteniendo valores por encima del VO₂ (Skinner y McLellan, 1980).

3.5.4. Adquisición y tratamiento de las muestras sanguíneas

Para la valoración de los diferentes parámetros bioquímicos se extrajeron 2 tomas de sangre de la vena cubital en tubos de cristal de 10 mL con EDTA. La toma de muestras sanguíneas se realizaba al inicio y al final del estudio, previo al primer día de la ingesta de tetraselmis chuii y posterior a la finalización de la ingesta, en el GS y de forma similar en el GC.

Tras la extracción sanguínea, una vez extraída la cantidad necesaria las muestras eran inmediatamente centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, separado el plasma de la sangre se guardaban a -30°C.

3.5.5. Valoración cardiorrespiratoria

A partir de los datos obtenidos en el desarrollo del protocolo de esfuerzo, se tomaron los valores de los parámetros absolutos cardiorrespiratorios derivados de las diferentes mediciones anteriormente explicadas. Una vez que estaban todos los parámetros absolutos (VE , VO_2 , VCO_2 , etc), se calcularon los parámetros cardiorrespiratorios relativos contemplados en las variables del presente estudio, tal como se detallan a continuación:

- Consumo de oxígeno relativo al peso corporal: $VO_2/Peso$
- Consumo de oxígeno relativo al peso muscular: $VO_2/Peso$ muscular

- Cociente respiratorio: VCO_2/VO_2
- Equivalente de oxígeno: VE/VO_2
- Equivalente de dióxido de carbono: VE/VCO_2
- Pulso de oxígeno: VO_2/FC

Todos los parámetros descritos fueron calculados para cada punto del protocolo de esfuerzo.

3.5.6. Valoración del hemograma.

De cada tubo de sangre, extraído antes y después de la prueba de esfuerzo, se tomaba una muestra de 200 μ L, que era precipitada en un cacillo y colocada en el coulter (Coulter Electronics LTD. Model 6706319. Northwell Drive, Luton. England).

3.5.7. Valoración del metabolismo energético

La determinación en plasma de la glucosa, colesterol, triglicéridos... se realizó mediante técnicas de espectrofotometría utilizando un autoanalizador coulter (Coulter Electronics LTD. Model 6706319. Northwell Drive, Luton. England).

3.5.8. Valoración del estrés oxidativo y respuesta antioxidante

Para la valoración de la respuesta antioxidante del organismo se midieron los cambios producidos en los niveles de vitamina A, vitamina E, y ácido úrico en cada uno de los momentos de extracción sanguínea descritos en el protocolo de esfuerzo tanto en plasma como en eritrocitos.

Para la determinación de las vitaminas A y E (vitaminas liposolubles) se utilizó la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) según la técnica descrita por Shearer (1986). Mediante la comparación con los patrones internos utilizados (acetato de α -tocoferol y acetato de retinol), se calculó la concentración plasmática en $\mu\text{g/ml}$ de vitaminas A y E de la muestra.

3.5.9. Valoración de los ácidos grasos eritrocitarios: índices de peroxidación lipídica.

Determinamos los ácidos grasos eritrocitarios, para evaluar una posible peroxidación de sus membranas como indicaron Haliwell y Gutridge (1985).

Para la determinación de los ácidos grasos se utilizó la técnica descrita por Lepage y Roy (1986). La identificación de los ácidos grasos se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención de los derivados metilados de los ácidos grasos problemas, con los ácidos grasos patrones, en las mismas condiciones cromatográficas y utilizando el parámetro de retención relativa al patrón interno (C17:0) y comparados con los espectros de las galerías contenidas en las espectrotecas.

El resultado de los ácidos grasos se expresa en forma de porcentaje.

Índices utilizados a partir de los porcentajes de los ácidos grasos analizados

Tras la obtención de los valores de ácidos grasos eritrocitarios se procede al cálculo de una serie de índices, con el objetivo de observar el efecto frente al esfuerzo.

1- Índices obtenidos de los porcentajes de ácidos grasos:

- AGS (ácidos Saturados: 12:0 + 14:0 + 16:0 + C18:0 + 20:0 + 24:0)
- AGMI (ác. Monoinsaturados: 14:1 + 16:1 + 18:1 + 18:1t + 24:1)
- Insaturados n6: 18:2 n6 + 18:3 n6 + 20:3 n6 + 20:4 n6
- Insaturados n3: 18:3 n3 + 20:5 n3 + 22:5 n3 + 22:6 n3
- Insaturados totales: insaturados n6 + insaturados n3
- PEROX1: relación entre 20:4 n6/ 20:0.
- PEROX 2: relación entre 20:4 n6/18:0.
- PEROX 3: relación entre 20:4 n6/16:0
- PEROX 4: relación entre 20:4 n6/14:0.
- PEROX 5: relación entre 20:4 n6//12:0.
- PEROX6: relación entre 22:6 n3/18:0.
- PEROX7: relación entre 22:6 n3/16:0
- PEROX8: relación entre 22:6 n3/14:0
- PEROX9: relación entre 22:6 n3/14:0
- PEROX10: relación entre 22:6 n3/12:0
- Índice n6/n3: relación entre insaturados n6 e insaturados n3.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de los resultados fue realizado mediante el programa estadístico SPSS 19.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

En primer lugar, se realizó una exploración de las diferentes variables para determinar la normalidad, teniendo en cuenta la significación Shapiro-Wilks, recomendada para muestras de menos de 30 individuos.

Para el análisis de la evolución de los diferentes parámetros a lo largo del estudio se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon y para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de la t de Student.

Se aceptaron como significativas aquellas diferencias con una probabilidad de ser debidas al azar menor o igual al 5% ($p \leq 0,05$).

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para un mejor seguimiento por el lector presentamos de forma consecutiva los resultados y discusión de cada uno de los apartados que forman este estudio, estructurados en base a los diferentes objetivos planteados, presentando en primer lugar aquellos parámetros que sirven de control del rendimiento del deportista, para posteriormente analizar otros parámetros menos habituales en el control y seguimiento de deportistas de alto nivel como el estrés oxidativo, la respuesta antioxidante, cambios en los ácidos grasos de las membranas de eritrocitos.

4.1. VALORACIÓN DEL RENDIMIENTO FÍSICO

4.1.1. Valoración antropométrica

Tabla 21. Valores Antropométricos en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio.

	G.C		G. S	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Peso total	69,55±4,70	69,10±5,80	69,74±5,89	69,05±5,80
Σ6 Pliegues	68,00±18,21	68,12±17,95	68,38±18,67	59,24±18,05* ^φ
% Muscular	48,39±1,70	48,45±2,67	48,48±1,65	49,24±2,88
% Oseo	17,15±0,83	17,20±1,70	17,10±0,87	17,25±2,72
% Grasa	10,41±1,60	10,37±1,70	10,30±1,79	9,39±1,39* ^φ

*p<0.05 test de Wilcoxon; ^φ p<0.05 test de Student

En la tabla 21 encontramos los valores de las medidas antropométricas tomadas antes y después de la suplementación al GS y GC. En ella se observa un descenso significativo en el sumatorio de 6 pliegues y el porcentaje de grasa corporal.

Este descenso significativo en el sumatorio de 6 pliegues y el porcentaje de grasa corporal, que no se produjo en el grupo control, podría ser debido a que los deportistas realizaron entrenamientos de mayor intensidad, que les haría perder peso graso o bien que el alga disponga de algún componente no identificado que provocase una mayor utilización de las grasas como sustrato energético. Al hablar con el preparador físico indicó que no se cambió ni la intensidad ni el volumen de los entrenamientos en todo el periodo del estudio. En este sentido, algunos elementos minerales como el cromo o el vanadio tienen la propiedad de mejorar el metabolismo lipídico en las células corporales. En los estudios realizados sobre elementos minerales en el alga estudiada, estos dos elementos no han sido evaluados, por lo que desconocemos si existen en el alga y a que concentración se encuentran y por tanto no podemos descartar esta posibilidad.

4.1.2. Análisis del estudio ergoespirométrico

Con el fin de evaluar un posible efecto ergogénico y la capacidad cardio-respiratoria de nuestros deportistas, se les sometió a una prueba en tapiz rodante.

Los resultados hacen referencia a cuatro momentos fundamentales de dicha prueba: umbral aeróbico, umbral anaeróbico, final de la prueba y tras 3 minutos de recuperación.

Así, en la tabla 22, presentamos los resultados obtenidos por los sujetos del estudio en la zona donde se considera se encuentra el umbral aeróbico. En ella se observan que los valores son muy similares en el GC y GS, tanto antes como después del periodo de suplementación.

Tabla. 22. Valores ergoespirométricos encontrados en el umbral aeróbico en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio.

	G.C		G. S	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Km/h	10,55±0,69	10,62±1,12	10,71±0,73	10,50±1,09
FC (ppm)	155,95±10,1	155,50±11,55	156,50±11,1	154,50±12,55
VO ₂ (l/min)	2,45±0,22	2,50±0,20	2,49±0,30	2,56±0,27
VO ₂ /kg (ml/min/kg)	35,40±2,50	35,80±3,01	35,51±2,87	36,59±3,11
VCO ₂ (l/min)	2,20±0,25	2,31±0,31	2,23±0,26	2,31±0,30
RER	0,90±0,02	0,90±0,01	0,90±0,02	0,90±0,03
Pulso O ₂ (ml/beat)	15,90±2,09	15,99±1,10	15,93±2,10	16,55±1,04
VE (l/min)	68,30±11,05	68,52±11,01	68,29±11,38	70,50±11,09
VE/VO ₂	25,50±2,36	25,55±2,22	25,64±2,76	25,77±2,29
VE/VCO ₂	28,59±2,64	28,60±2,13	28,60±2,74	28,61±2,04

En la tabla 23, se presentan los resultados obtenidos en la zona del umbral anaeróbico respiratorio de los deportistas. En ella llama la atención una disminución significativa ($p < 0.05$) en la frecuencia cardíaca de los sujetos que fueron suplementados. Ello indicaría una menor dificultad para trabajar en esta zona en los deportistas suplementados y una menor sensación fisiológica percibida de carga. Esta situación en el umbral anaeróbico podría indicar una mejor economía metabólica de esfuerzo, como la que se obtiene con un mayor grado de entrenamiento (Willmore y Costill, 2007).

Tabla 23. Valores ergoespirometricos encontrados en el umbral anaeróbico en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio.

	G.C		G.S	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Km/h	15,45±1,32	15,40±1,12	15,50±1,02	15,17±1,34
FC (ppm)	184,23±6,80	183,95±7,75 ^φ	184,57±7,00	177,92±7,75* ^φ
VO ₂ (l/min)	3,33±0,41	3,34±0,24	3,34±0,43	3,35±0,26
VO ₂ /kg(ml/min/kg)	47,60±3,65	47,98±3,56	47,71±3,97	48,06±3,26
VCO ₂ (l/min)	3,40±0,42	3,39±0,30	3,41±0,41	3,38±0,27
RER	1,02±0,01	1,01±0,01	1,02±0,02	1,01±0,01
Pulso O ₂ (ml/beat)	18,49±1,20	18,51±1,28	18,52±1,80	18,60±1,26
VE (l/min)	108,34±9,43	107,10±9,90	108,14±9,48	105,00±10,00
VE/VO ₂	29,80±2,41	29,73±2,48	29,83±2,47	29,69±2,58
VE/VCO ₂	29,27±2,29	29,45±2,45	29,24±2,23	29,49±2,55

* $p < 0.05$ test de Wilcoxon; ^φ $p < 0.05$ test de Student

En la tabla 24, se presentan los valores a los que los deportistas llegan al final de la prueba, la extenuación. En ella, llama poderosamente la atención que, aun corriendo a velocidades similares, los deportistas que fueron suplementados presentaban una disminución altamente significativa ($p < 0.01$) en la frecuencia cardiaca máxima y un incremento significativo ($p < 0.05$) en el consumo máximo de oxígeno, tanto en valores absolutos como relativos al peso corporal y el pulso de oxígeno. Estos datos indicarían un claro efecto ergogénico atribuible a la ingesta del alga.

Tabla 24. Valores ergoespirometricos encontrados al final de la prueba en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio.

	G.C		G. S	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Km/h	19,60±0,89	19,58±0,92	19,64±0,93	19,42±0,90
FC (ppm)	198,50±5,18	198,38±4,63	198,43±6,28	195,42±4,52** ^φ
VO ₂ (l/min)	3,74±0,39	3,73±0,31	3,75±0,49	3,82±0,36 ^φ
VO ₂ /kg (ml/min/kg)	53,49±3,25	53,55±3,40	53,56±4,26	54,74±3,43* ^φ
VCO ₂ (l/min)	4,34±0,40	4,34±0,39	4,35±0,59	4,35±0,41
RER	1,17±0,04	1,16±0,03	1,17±0,05	1,16±0,04
Pulso O ₂ (ml/beat)	19,06±2,40	19,08±2,41	19,04±2,53	20,08±2,25* ^φ
VE (l/min)	143,00±17,21	144,01±18,98	142,14±18,2	146,50±19,35
VE/VO ₂	36,50±4,11	37,00±4,09	36,63±4,57	37,52±4,02
VE/VCO ₂	31,61±2,23	31,98±2,32	31,68±2,73	32,49±2,85

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ test de Wilcoxon; ^φ $p < 0.05$, ^{φφ} $p < 0.05$ test de Student

En la tabla 25, vemos los valores alcanzados por los deportistas tras tres minutos de recuperación pasiva (parados). En ella, llama la atención un resultado, estadísticamente significativo, descenso de la frecuencia cardiaca ($p < 0.05$), únicamente en los deportistas que siguieron la suplementación. Ello indicaría que la toma del alga produjo una mayor recuperación interna de los deportistas ante un esfuerzo máximo.

Tabla 25. Valores ergoespirométricos encontrados tras tres minutos de recuperación, en reposo, en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio.

	G.C		G. S	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Km/h	0	0	0	0
FC (ppm)	131,23±12,12	130,90±12,20	131±12,51	125,50±12,29** ^{φφ}
VO ₂ (l/min)	0,95±0,38	0,92±0,19	0,96±0,28	0,87±0,16
VO ₂ /kg (ml/min/kg)	13,29±2,45	13,01±2,15	13,57±3,05	12,38±2,05
VCO ₂ (l/min)	1,20±0,37	1,15±0,25	1,24±0,38	1,10±0,20
RER	1,28±0,10	1,30±0,09	1,29±0,11	1,27±0,07
Pulso O ₂ (ml/beat)	7,32±1,32	7,01±1,01	7,38±2,35	6,87±0,94
VE (l/min)	46,90±14,51	45,11±12,36	47,14±15,57	42,17±10,40
VE/VO ₂	45,40±5,97	45,32±5,68	45,58±6,88	44,76±5,08
VE/VCO ₂	35,28±3,70	35,26±3,57	35,34±3,83	35,31±3,47

** $p < 0.01$ test de Wilcoxon; ^{φφ} $p < 0.01$ test de Student

La evaluación de los parámetros ergoespirométricos pone de manifiesto una clara mejoría en la función cardíaca y respiratoria de los deportistas suplementados, como lo refleja los valores más bajos de la frecuencia cardíaca en todas las fases del esfuerzo en los deportistas, siendo mucho más manifiesta

al final del esfuerzo y en la recuperación. También el incremento en el consumo máximo de oxígeno con la suplementación y ese mejor funcionamiento cardíaco indicaría unas propiedades ergogénicas del alga.

4.2. VALORACIÓN SANGUINEA

4.2.1. Hemograma

Tabla 26. Hemograma completo en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio.

	G.C		G. S	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Hematíes	5,40±0,31	5,39±0,35	5,43±0,34	5,37±0,39
HB	15,49±0,80	15,50±0,94	15,52±1,00	16,28±0,74** ^{φφ}
Hematocrito	48,29±2,72	48,23±2,15	48,31±2,75	46,68±2,25*
VCM	88,00±2,55	87,84±3,08	88,10±2,75	85,49±4,05
HCM	28,31±1,60	28,46±1,69	28,30±1,57	29,82±1,71** ^φ
Plaquetas	223,67±70,05	225,39±65,56	222,72±90,05	241,31±46,99
VPM	9,00±1,42	9,01±1,20	9,02±1,53	8,04±1,19** ^φ
Leucocitos	6,57±1,17	6,43±1,73	6,55±1,67	5,86±1,73
Linfocitos	1,90±0,60	1,89±0,33	1,89±0,61	1,79±0,42
Neutrófilos	3,78±1,10	3,65±1,12	3,77±1,24	3,08±1,09
Monocitos	0,40±0,12	0,43±0,20	0,39±0,15	0,49±0,24
Basófilos	0,05±0,02	0,06±0,05	0,05±0,03	0,08±0,06
Eosinófilos	0,28±0,18	0,25±0,19	0,28±0,19	0,21±0,20
VSG	6,59±2,80	6,01±2,90	6,63±3,61	5,13±2,73

*p<0.05, ** p<0.01 test de Wilcoxon; ^φ p<0.05, ^{φφ} p<0.05 test de Student

En la tabla 26, se presentan los resultados en el hemograma al inicio y final de la suplementación. En ella encontramos un aumento altamente significativo en la concentración de hemoglobina y la hemoglobina corpuscular media (HCM) al final del estudio en el GS, acompañado de un descenso significativo en el valor del hematocrito, no apreciándose estos cambios en el GC.

Sorprende los aumentos que sufrieron todos los sujetos suplementados en la concentración de la hemoglobina, a pesar de sufrir un descenso del hematocrito. Entendemos que este incremento podría estar en relación con la presencia en el alga de algún factor hematopoyético que después de un mes de tratamiento generase estas elevaciones.

En este sentido es conocido que el cloruro de cobalto es un factor eritropoyético (Lantin y cols., 2011; Lippi y cols, 2005) y su presencia en el alga podría ser la causa de este incremento significativo de la hemoglobina en los deportistas que la tomaron. Otra posibilidad es que con el proceso de digestión del alga utilizada se pueda obtener algún péptido bioactivo con propiedades hematopoyéticas como los obtenidos ya en relación a otras áreas biomédicas como inmunomodulación, antihipertensiva o anticancerígena (Xiaodan y cols., 2014).

Entendemos que es un hallazgo de interés tanto para el rendimiento deportivo como para situaciones de anemia.

4.2.2. Bioquímica general.

Tabla 27. Evolución de algunos parámetros bioquímicos plasmáticos en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio.

	G.C		G.S	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Glucosa	84,02±8,29	85,10±6,30	83,01±10,31	91,01±5,40** ϕ
Colesterol. T	113,11±20,81	110,78±25,15	112,27±22,73	107,78±24,40
Triglicéridos	51,44±26,20	49,60±20,30	50,79±35,39	43,59±19,07
Ac. Úrico	5,74±0,72	5,75±0,73	5,76±0,76	6,04±0,77*
HDL	52,02±6,50	53,60±7,61	51,14±6,35	55,54±7,50
LDL	50,37±20,21	49,12±20,11	50,97±20,62	43,58±20,91
GOT	36,23±13,76	36,11±12,93	36,79±14,91	36,06±11,96
GPT	27,45±14,12	26,88±12,31	27,32±15,12	25,88±10,38
GGT	21,40±18,06	22,02±17,21	21,53±19,07	22,25±17,46
Creatinina	0,96±0,11	0,97±0,10	0,96±0,10	1,07±0,12** ϕ

*p<0.05, ** p<0.01 test de Wilcoxon; ϕ p<0.05 test de Student

En la tabla 27, se muestran los valores de algunos parámetros bioquímicos relacionados con distintos sistemas corporales. En todos los casos los parámetros estudiados estaban dentro de los valores considerados como normales. Destacan los aumentos significativos en la glucosa, ácido úrico y creatinina en los sujetos suplementados. El aumento del ácido úrico podría estar en relación con una mejora en la vía de la xantina oxidasa. No encontramos una justificación para estas diferencias en los otros dos parámetros.

La valoración de los parámetros bioquímicos nos pone de manifiesto, sobre todo, que la toma del alga no produjo ningún efecto negativo en el organismo de los deportistas.

4.3. ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE

4.3.1. Valoración de los ácidos grasos en eritrocitos.

Una de las consecuencias del estrés oxidativo en las células es la peroxidación lipídica de los principales ácidos grasos poliinsaturados. Este proceso destruye los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular transformándolos en ácidos grasos saturados de cadena menor. Por ello, Halliwell y Gutteridge (1985) propusieron que la presencia en membranas de mayores niveles de ácidos grasos saturados, acompañados de una disminución de los insaturados sería consecuencia de la acción de los radicales libres de oxígeno, indicando como un posible índice de peroxidación lipídica la relación entre los ácidos grasos insaturados y los saturados. Es por ello que nosotros hemos seleccionado este método, más complejo que otros, pero muy efectivo para evaluar el posible estrés oxidativo de nuestros sujetos.

En la tabla 28, observamos en el GS que los ácidos grasos palmítico (16:0) ($p < 0.01$), esteárico (18:0) ($p < 0.05$) y saturados en total ($p < 0.01$) presentaban valores inferiores tras la suplementación con el micro alga, algo que no ocurría en el GC.

Tabla 28. Porcentaje de ácidos grasos encontrados en la membrana de los eritrocitos de los deportistas del grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio.

A.G.	G. C		G. S	
	Inicio	Final	Inicio	Final
12.0	0,46±0,11	0,43±0,30	0,47±0,13	0,42±0,31
14.0	0,25±0,34	0,37±1,01	0,21±0,12	0,63±1,18
14.1	3,10±0,39	3,00±0,28	3,08±0,45	2,93±0,29
16.0	30,30±2,01	30,25±2,12	30,39±2,00	28,74±2,28**
16.1	0,20±0,24	0,68±2,45	0,21±0,22	1,35±3,12
18.0	18,14±0,60	18,10±1,57	18,49±0,78	16,72±2,54*
18.1	14,32±0,64	14,15±0,81	14,49±0,75	13,86±0,94
18.1.T	1,03±0,20	0,99±0,16	1,05±0,30	0,96±0,36
18.2	11,50±2,26	12,00±2,11	11,10±2,96	12,95±2,06
18.36	0,29±0,13	0,29±0,12	0,29±0,15	0,29±0,14
18.33	0,48±0,39	0,42±0,29	0,50±0,42	0,33±0,28
20.0	0,13±0,10	0,15±0,23	0,11±0,13	0,26±0,39
20.3	1,33±0,40	1,65±1,03	1,27±0,40	1,97±1,92
20.4	12,50±1,15	12,82±1,18	12,62±1,11	12,94±1,24
20.5	0,27±0,15	0,28±0,24	0,25±0,16	0,31±0,28
22.5	2,61±0,93	2,63±0,46	2,62±0,96	2,65±0,40
24.0	0,71±0,12	0,71±0,28	0,72±0,13	0,72±0,29
22.6	0,41±0,29	0,39±0,19	0,42±0,32	0,32±0,16
24.1	1,69±0,66	1,68±0,56	1,71±0,76	1,62±0,66
SAT	50,26±2,21	50,00±3,32	50,39±2,19	47,49±3,77**
MIN	19,00±0,78	19,10±2,30	18,83±0,94	19,11±2,90
POLI6	16,50±1,40	16,90±2,10	16,18±1,62	17,12±2,48
POLI3	3,75±0,78	3,61±0,42	3,80±0,88	3,62±0,25
POLIIT	19,95±1,73	20,00±1,92	19,98±1,90	20,74±2,53
n6/n3	4,60±1,02	4,78±1,00	4,48±1,07	4,81±0,97

*p<0.05 test de Wilcoxon; ^φ p<0.05 test de Student

En los índices que propusimos relacionando las familias n6 (20:4) y n3 (22:6) de ácidos grasos poliinsaturados con los saturados 20:0, 18:0, 16:0, 14:0 y 12:0, encontramos que son los relacionados con la familia n6, PEROX2 (20:4/18:0) p<0.05 y PEROX3 (20:4/16:0) p<0.01 fueron los que presentaron un aumento significativo, lo que estaría en relación con una menor peroxidación

lipídica en los deportistas del GS, presentando una diferencia significativa en el índice PEROX3 ($p < 0.05$), tabla 29.

Tabla 29. Valores hallados para los índices de peroxidación lipídica en los eritrocitos en el grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio.

PEROX	G. C		G. S	
	Inicio	Final	Inicio	Final
PEROX1	26,10±25,61	34,34±33,11	24,78±28,60	42,11±38,18
PEROX2	0,68±0,04	0,69±0,09	0,68±0,06	0,79±0,12*
PEROX3	0,42±0,04	0,41±0,04	0,41±0,07	0,45±0,08** ^φ
PEROX4	45,00±22,32	40,97±26,35	44,96±28,69	39,52±27,72
PEROX5	29,10±9,80	27,89±19,10	29,46±10,53	26,89±19,49
PEROX6	1,13±1,58	1,15±1,14	1,11±1,78	1,18±1,08
PEROX7	0,02±0,02	0,02±0,02	0,02±0,02	0,02±0,01
PEROX8	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01
PEROX9	1,61±1,50	1,45±0,98	1,69±1,89	1,12±0,82
PEROX10	0,94±0,54	0,90±0,58	0,96±0,64	0,82±0,69

* $p < 0.05$ test de Wilcoxon; ^φ $p < 0.05$ test de Student

4.3.2. Valoración de la respuesta antioxidante no enzimática

4.3.2.1. Vitamina A y E.

A continuación, se muestran los datos obtenidos en vitamina A y E eritrocitaria y plasmática de los deportistas.

Tabla 30. Valores de Vitaminas A y E ($\mu\text{g/ml}$) en eritrocitos del grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio.

Eritrocitos	G. C		G. S	
	Inicio	Final	Inicio	Final
CVA (vit. A)	4,20±0,22	4,35±0,67	4,27±0,52	4,43±0,65
CVE (Vit. E)	37,13±6,87	37,25±16,12	37,61±5,71	42,65±17,06* ^φ

* $p < 0.05$ test de Wilcoxon; ^φ $p < 0.05$ test de Student

En la tabla 30, se presentan las concentraciones eritrocitarias de la vitamina A y E en los dos grupos de estudio. En ella se puede apreciar unos valores significativamente más elevados de vitamina E en los sujetos tras la suplementación con el alga y también en el GS respecto al GC.

Tabla 31. Valores de Vitaminas A y E ($\mu\text{g/ml}$) en plasma del grupo control y el grupo suplementado al inicio y final del estudio.

Plasma	G. C		G. S	
	Inicio	Final	Inicio	Final
CVA (vit. A)	1,10 \pm 0,67	1,02 \pm 0,22	1,12 \pm 0,75	0,81 \pm 0,28
CVE (Vit. E)	7,91 \pm 5,10	8,10 \pm 4,16	7,95 \pm 5,54	11,20 \pm 4,18**

* $p < 0.05$ test de Wilcoxon; ϕ $p < 0.05$ test de Student

En la tabla 31, se presentan las concentraciones en plasma de vitamina A y E, en ella se puede observar cómo, al igual que ocurrió en los eritrocitos, la concentración más alta se presentó en los sujetos al final del periodo de suplementación en el GS no produciéndose este incremento en el GC.

Como ya se indicó en la introducción la Vitamina E es el antioxidante más importante de que dispone la célula en los compartimentos lipídicos para defenderse de los radicales libres de oxígeno, por tanto, el aumento significativo de sus concentraciones tanto en eritrocitos como en el plasma del GS podría ser la causa por la que los índices de peroxidación lipídica son más bajos tras la suplementación en estos sujetos y, sin embargo, no sufren modificación en los no suplementados. Este aumento de vitamina E en los suplementados con el alga estaría en relación con las importantes concentraciones que posee el alga

suplementada o la presencia de algún péptido biogénico antioxidante como indicaron Fan y cols. (2014).

Las concentraciones más elevadas en vitamina E, tanto en plasma como en eritrócito, unido a una menor concentración en membranas de ácidos grasos saturados nos indicaría que la toma de la microalga estaría mejorando el estrés oxidativo de nuestros deportistas y como indicaron recientemente Capó y cols. (2016) una mejora en los procesos relacionados con los radicales libres y el ejercicio físico.

Esta mejora en el estrés oxidativo junto con el aumento de la hemoglobina, llevaría a un estado de mejor rendimiento físico como reflejan los cambios encontrados en nuestro estudio.

Los datos encontrados en este estudio obligan a realizar estudios futuros relacionados con:

- Posibles cambios en la composición corporal en otras poblaciones.
- Estudios para la evaluación del efecto eritropoyético de este alga, que podría tener gran interés en medicina clínica.
- Estudios conducidos a comprobar a que serían debidos este efecto antioxidante.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

La toma de un comprimido al día, durante un mes, de la microalga *Tetraselmis chuii* (tetraSOD®) produjo:

- 1- Disminución de los niveles de grasa periféricos.
- 2- Una disminución en la frecuencia cardiaca, en el umbral anaerobico, final de la prueba y recuperación que indicaría una mejora en el rendimiento en la prueba de esfuerzo.
- 3- Un aumento del consumo máximo al final de la prueba.
- 4- La hemoglobina sufrió un incremento altamente significativo acompañado de un descenso en el hematocrito.
- 5- La glucosa aún estando en valores normales se encontraba en valores mas elevados tras la suplementación.
- 6- Los acidos grasos saturados 16:0 y 18:0 descendieron en eritrocitos tras la suplementación.
- 7- Los indices de peroxidación lipídica en relación a los ácidos grasos eritrocitarios indican la presencia de una menor peroxidación lipídica tras la suplementación.
- 8- La vitamina E se elevó significativamente tanto en eritrocito como en plasma tras la suplementación.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-González, J., J.A. Vargas-Zamora, E. Gómez-Ramírez & Jairo García-Céspedes. 2004. *Hidrocarburos de petróleo, disueltos y dispersos, en cuatro ambientes costeros de Costa Rica*. Rev. Biol. Trop. 52 (Suppl. 2): 43-50.
- Aguilo, A., Tauler, P., Fuentespina, E., Tur, J.A., Cordova, A., Pons, A. (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 84(1), 1-7.
- Aguilo, A., Tauler, P., Pilar Guix, M., Villa, G., Cordova, A., Tur, J.A., Pons, A. (2003). Effect of exercise intensity and training on antioxidants and cholesterol profile in cyclists. *J Nutr Biochem* 14(6), 319-325.
- Ahamad, M. F., Ashraf, S. A., Ahmad, F. A., Ansari, J. A., Siddiquee, M. R. A. (2011). *Neutraceutical market and its regulation*. *American Journal of Food Technology*, 6, 342–343.
- Ahlberg, E. y Clack, A., 2006. *A firm step from water to land*. *Nature*, 440: 747-749.
- Ahn, C. B.; Jeon, Y. J.; Kang, D. S.; Shin, T. S.; Jung, B. M. (2004). Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Scytosiphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry. *Food Res. Int.*, 37, 253–258.
- Ahn, G., Hwang, I., Park, E. J., Kim, J. H., Jeon, Y. J., Lee, J. H., et al. (2008). Immunomodulatory effects of an enzymatic extracts from *Ecklonia cava* on murine splenocytes. *Mar. Biotechnol.* 10, 278– 289.

- Alessio, H.M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 25(2), 218-224.
- Alessio, H.M., Goldfarb, A.H. (1988). Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J Appl Physiol* 64(4), 1333-1336.
- Allen, R.G., Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28(3), 463-499.
- Almar, M., Villa, J.G., Cuevas, M.J., Rodriguez-Marroyo, J.A., Avila, C., Gonzalez-Gallego, J. (2002). Urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of oxidative damage in road cycling. *Free Radic Res* 36(3), 247-253.
- Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(11), 6858-6862.
- Aruoma, O. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol* 32, 671-683.
- Ashton, T., Young, I.S., Peters, J.R., Jones, E., Jackson, S.K., Davies, B., Rowlands, C.C. (1999). Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J Appl Physiol* 87(6), 2032-2036.
- Bailey, D.M., Young, I.S., McEneny, J., Lawrenson, L., Kim, J., Barden, J., Richardson, R.S. (2004). Regulation of free radical outflow from an

- isolated muscle bed in exercising humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(4), 1689-1699.
- Baker, J.S., Bailey, D.M., Hullin, D., Young, I., Davies, B. (2004). Metabolic implications of resistive force selection for oxidative stress and markers of muscle damage during 30 s of high-intensity exercise. *Eur J Appl Physiol* 92, 321-327.
 - Becker, E. W. (2007): «Micro-algae as a source of protein»; *Biotechnol* (25); pp. 207-210.
 - Benito, P.J. (2004). Estudio del modelo respiratorio: Nuevo método de determinación de los umbrales ventilatorios. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid.
 - Bigard, A.X. (2001). Exercise-induced muscle injury and overtraining. *Sci Sports* 16(A), 204-215.
 - Bloomer, R.J., Goldfarb, A.H., Wideman, L., McKenzie, M.J., Consitt, L.A. (2006). Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res* 19(2), 276-285.
 - Borowitzka, M.A. (1988). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology* 4: 267–279.
 - Bowles, D.K., Torgan, C.E., Ebner, S., Kehrer, J.P., Ivy, J.L., Starnes, J.W. (1991). Effects of acute, submaximal exercise on skeletal muscle vitamin E. *Free Radic Res Commun* 14, 139-143.
 - Brancaccio, P., Lippi, G., Maffulli, N. (2010). Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med* 48(6), 757-767.

- Brazo-Sayavera, J. (2012). *Efectos del grado de entrenamiento sobre parámetros ergoespirométricos, metabólicos y de estrés oxidativo en diferentes intensidades de esfuerzo*. Cáceres: Universidad de Extremadura.
- Breen, A.P., Murphy, J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 18, 1033-1077.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1–4), 315–331.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey, J.K. Volkman, and G.A. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151: 315–331.
- Brownlee, I., Fairclough, A., Hall, A., Paxman J. (2011). Dietary seaweed and human health. *Culin. Arts Sci*. VII: 82–88.
- Burton, G.W., Joyce, A., Ingold, K.U. (1982). First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 2, 327.
- Burton, G.W.,Traber, M.G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr* 10, 357-382.
- Burton, G.W., Joyce, A., Ingold, K.U. (1983). Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 221, 281-290.
- Burton, G.W.,Traber, M.G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr* 10, 357-382.
- Cachia, O., Benna, J.E., Pedruzzi, E., Descomps, B., Gougerot-Pocidaló,

- M.A., Leger, C. L. (1998). Alpha-tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47 (phox) membrane translocation and phosphorylation. *J Biol Chem* 273(49), 32801-32805.
- Camus, G., Felekidis, A., Pincemail, J., Deby-Dupont, G., Deby, C., Juchmes-Ferir, A., Lejeune, R., Lamy, M. (1994). Blood levels of reduced/oxidized glutathione and plasma concentration of ascorbic acid during eccentric and concentric exercises of similar energy cost. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 102(1), 67-70.
 - Camus, G., Pincemail, J., Roesgen, A., Dreezen, E., Sluse, F.E., Deby, C. (1990). Tocopherol mobilization during dynamic exercise after beta-adrenergic blockade. *Arch Int Physiol Biochim* 98(1), 121-126.
 - Cashmore, G.C., Davies, C.T., Few, J.D. (1977). Relationship between increases in plasma cortisol concentration and rate of cortisol secretion during exercise in man. *J Endocrinol* 72, 109-110.
 - Capelli, B. y Cysewski, G. (2012): «Interal Beauty Pill? Sunscreen in a pill?»; *The world's best kept health secret: Natural Astaxanthin*. Cyanotech Corporation.
 - Capó, X., Martorell, M., Sureda, A., Riera, J., Drobnic, F., Tur, J.A., Pons, A. (2016). Effects of Almond- and Olive Oil-Based Docosahexaenoic- and Vitamin E-Enriched Beverage Dietary Supplementation on Inflammation Associated to Exercise and Age. *Nutrients*. 9;8(10).
 - Cavas, L., Tarhan, L. (2004). Effects of vitamin-mineral supplementation on cardiac marker and radical scavenging enzymes, and MDA levels in young swimmers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 14, 133-146.

- Cavender, A. (2006). Folk medical uses of plant foods in southern Appalachia, United States. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(1), 74–84.
- Cha, S.H., Ahn, G.N., Heo, S.J., Kim, K.N., Lee, K.W., Song, C. B. (2006). Screening of extracts from marine green and brown algae in Jeju for potential marine angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 35, 307–314.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49, 481-493.
- Chevion, S., Moran, D.S., Heled, Y., Shani, Y., Regev, G., Abbou, B., Berenshtein, E., Stadtman, E.R., Epstein, Y. (2003). Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9), 5119-5123.
- Chew, B. P.; Park, J. S.; Wong, M. W. y Wong T. S. (1999): «A comparison of the anticancer activities of dietary b-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo»; *Anticancer Res.* (19); pp. 1.849-1.854.
- Clarkson, P.M., Thompson, H.S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*, 72(Suppl 2), 637S-646S.
- Coll, M. & J. Cortés & D. Sauma. 2004. Características físico-químicas y determinación de plaguicidas en el agua de la laguna de Gandoca, Limón, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52(Suppl. 2): 33-42.
- Cohen, D.; Finkel, A. y Sussman, M. (1976): «On the role of algae in larviculture of *Macrobrachium rosenbergii*»; *Aquaculture* (8); pp. 199-207.
- Coombes, J.S., Powers, S.K., Rowell, B., Hamilton, K.L., Dodd, S.L.,

- Shanely, R.A., Sen, C.K., Packer, L. (2001). Effects of vitamin E and alpha-lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. *J Appl Physiol* 90(A), 1424-1430.
- Couture, P., S. Visser, R. Vancoillie & C. Blaise. 1985. Algal bioassays their significance in monitoring water quality with respect to nutrients and toxicants. *Schweiz. Z. Hydrol.* 47: 127-158.
 - Daeschler, E.B., Shubin, N.H. & Jenkins, F.A., 2006. A Devonian tetrapod-like fish and the evolution of the tetrapod body plan. *Nature*, 440: 757-763.
 - Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324(Pt 1), 1-18.
 - DeFelice, S. L. (1995). The nutraceutical revolution: Its impact on food industry R&D. *Trends in Food Science & Technology*, 6(2), 59–61.
 - Dekkers, J.C., van Doornen, L. J., Kemper, H.C. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med* 21(3), 213-238.
 - Delong, E. F. (2007). Modern microbial seascapes. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 755–757.
 - Dettmar, P., Strugala, V., Craig Richardson, J. (2011). The key role alginates play in health. *Food Hydrocoll.*; 25:263–266.
 - Dhalla, N.S., Temsah, R.M., Netticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18(6), 655-673.

- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303–336.
- Duracková, Z., Gvozdjaková, A. (2008). *Oxidant, antioxidant and oxidative stress*. In A. Gvozdjaková (Ed.), *Mitochondrial medicine: Mitochondrial metabolism, diseases, diagnosis and therapy*. Hamburg: Springer.
- Duthie, G., Crozier, A. (2000). Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3, 447-451.
- Duthie, G.G., Robertson, J.D., Maughan, R.J., Morrice, P.C. (1990). Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys* 282(1), 78-83.
- Evans, P., Halliwell, B. (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 85 (Suppl 2), S67-S74.
- Evans, W.J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 72(Suppl 2), 647S-652S.
- Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Villiotou, V., Pouliopoulou, S., Fotinakis, P., Taxildaris, K., Deliconstantinos, G. (2004). Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Med Sci Sports Exerc* 36, 2065-2072.
- Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 36(4), 327-358.
- Fishbaine, B., Butterfield, G. (1984). Ascorbic acid status of running and sedentary men. *Int J Vitam Nutr Res* 54(2-3), 273.
- Fisher-Wellman, K., Bloomer, R.J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med*, 8, 1.

- Fitzgerald, C., Gallagher, E., O'Connor, P., Prieto, J., Mora- Soler, L., Greal, M., Hayes, M. (2013). Development of a seaweed derived platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) inhibitory hydro- lysate, synthesis of inhibitory peptides and assessment of their toxicity using the zebrafish larvae assay. *Peptides*, 50, 119–124.
- Franklin, N., J. Stauber, S. Markich & R. Lim. 2000. pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical fresh water alga (*Chlorella* sp.). *Aquat. Toxicol.* 48: 275-289.
- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 97, 5S-13S; discussion 22S-28S.
- Frei, B., England, L., Ames, B.N. (1989). Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(16), 6377-6381.
- Fuchs, J., Weber, S., Podda, M., Groth, N., Herrling, T., Packer, L., Kaufmann, R. (2003). HPLC analysis of vitamin E isoforms in human epidermis: correlation with minimal erythema dose and free radical scavenging activity. *Free Radic Biol Med* 34(3), 330-336.
- García-Céspedes, J., J. Acuña-González & J.A. Vargas-Zamora. (2004). Metales traza en sedimentos costeros de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52(Suppl. 2): 51-60.
- Gerster, H. (1991). Function of vitamin E in physical exercise: a review. *Z Ernährungswiss* 30(2), 89-97.
- Gleeson, M., Robertson, J.D., Maughan, R.J. (1987). Influence of exercise on ascorbic acid status in man. *Clin Sci* 73(5), 501-505.

- Goldfarb, A.H. (1999). Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol* 24(3), 249-266.
- Groussard, C., Machefer, G., Rannou, F., Faure, H., Zouhal, H., Sergent, O., Chevanne, M., Cillard, J., Gratas-Delamarche, A. (2003a). Physical fitness and plasma non-enzymatic antioxidant status at rest and after a wingate test. *Can J Appl Physiol* 28, 79-92.
- Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Vincent, S., Sergent, O., Cillard, J., Gratas-Delamarche, A. (2003b). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 89, 14-20.
- Guedes, A. C.; Amaro, H. M.; Malcata, X. F. (2011). Microalgae as source of high added-value compounds a brief review of recent work. *Biotechnol. Prog.*, 27, 597–613.
- Gupta, S.; Kass, G. E.; Szegezdi, E.; Joseph, B. (2009). The mitochondrial death pathway: a promising therapeutic target in diseases. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 1004–1033.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721-724.
- Halliwell, B, Chirico S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*.57 (5), 7155-7245.
- Halliwell, B., Aruoma, O. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281,

9-19.

- Halliwell, B., Cross, C.E. (1991). Reactive oxygen species, antioxidants, and acquired immunodeficiency syndrome. Sense or speculation? *Arch Intern Med* 151, 29-31.
- Halliwell, B., Grootveld, M. (1987). The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation. *FEBS Lett* 213, 9-14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1985). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Hankey, G. J. y Jamrozik, K. (1996): «Risk factors for stroke: lifestyle factors»; *Cardiovasc Risk Factors* (6); pp. 5-17.
- Heo, S. J.; Jeon, Y. J. (2008). Radical scavenging capacity and cytoprotective effect of enzymatic digests of *Ishige okumurae*. *J. Appl. Phycol*, 20, 1087–1095.
- Hillstrom, R.J., Yacopin-Ammons, A.K., Lynch, S.M. (2003). Vitamin C inhibits lipid oxidation in human HDL. *J Nutr* 133, 3047-3051.
- Imoff, J. F., Labes, A., & Wise, J. (2011). Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnology Advance*, 29, 468–482.
- Jammes, Y., Steinberg, J.G., Bregeon, F., Delliaux, S. (2004). The oxidative stress in response to routine incremental cycling exercise in healthy sedentary subjects. *Respir Physiol Neurobiol* 144(1), 81-90.
- Jenkins, R.R. (1993). Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Int J Sport Nutr* 3, 356-375.

- Jhonson, B.D., Padilla, J., Wallace, J.P. (2011). The exercise dose affects oxidative stress and brachial artery flow- mediated dilation in trained men. *Eur J Appl Physiol* 112, 33-42.
- Ji, L.L. (1995). Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med* 18(6), 1079-1086.
- Kang, K. H.; Kim, S. K. (2013). Beneficial effect of peptides from microalgae on anticancer. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 14 (3), 212– 217.
- Kanter, M.M. (1994). Free radicals, exercise, and antioxidant supplementation. *Int J Sport Nutr* 4, 205-220.
- Kanter, M.M., Nolte, L.A., Holloszy, J.O. (1993). Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J Appl Physiol* 74(2), 965-969.
- Klapcinska, B., Kempa, K., Sobczak, A., Sadowska-Krepa, E., Jagsz, S., Szoltysek, I. (2005). Evaluation of autoantibodies against oxidized LDL (oLAB) and blood antioxidant status in professional soccer players. *Int J Sports Med* 26, 71-78.
- Knez, W.L., Coombes, J.S., Jenkins, D.G. (2006). Ultra-endurance exercise and oxidative damage: implications for cardiovascular health. *Sports Med* 36(5), 429-441.
- Kostaropoulos, I.A., Nikolaidis, M.G., Jamurtas, A.Z., Ikonomidou, G.V., Makrygiannis, V., Papadopoulos G. y Kouretas, D. (2006). Comparison of the blood redox status between long- distance and short- distance runners. *Physiol Res* 55(6), 611-616.
- Kostka, T., Drai, J., Berthouze, S.E., Lacour, J.R., Bonnefoy, M. (1998).

Physical activity, fitness and integrated antioxidant system in healthy active elderly women. *Int J Sports Med* 19, 462-467.

- Koz, M., Erbas, D., Bilgihan, A., Aricioglu, A. (1992). Effects of acute swimming exercise on muscle and erythrocyte malondialdehyde, serum myoglobin, and plasma ascorbic acid concentrations. *Can J Physiol Pharmacol* 70, 1392- 1395.
- Krinsky, N. I.; Landrum, J. T. y Bone, R. A. (2003): «Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye»; *Ann. Rev. Nutr.* (23); 171-201.
- Lantin, A.C., Mallants, A., Vermeulen, J. Speybroeck, N., Hoet, P., Lison, D. (2011). Absence of adverse effect on thyroid function and red blood cells in a population of workers exposed to cobalt compounds. *Toxicology Lett*; 201(1):42-46.
- Laursen, P. (2001). Free Radicals and Antioxidant Vitamins: Optimizing the Health of the Athlete. *Strength Cond J* 23(2), 17-25.
- Lawrence, J.D., Bower, R.C., Riehl, W.P., Smith, J.L. (1975). Effects of alpha- tocopherol acetate on the swimming endurance of trained swimmers. *Am J Clin Nutr* 28(3), 205-208.
- Lawrence, J.D., Smith, J.L., Bower, R.C., Riehl, W.P. (1975). The effect of alpha tocopherol (vitamin E) and pyridoxine HCL (vitamin B6) on the swimming endurance of trained swimmers. *J Am Coll Health Assoc* 23(3), 219-222.
- Lindenschmidt, R. C.; Trika, A. F.; Guard, M. E.; Witschi, H. P. (1986). The effect of dietary butylated hydroxyl toluene on liver and colon tumor

development in mice. *Toxicology*, 38, 151–160.

- Livrea, M. A., Tesoriere, L., Bongiorno, A., Pintaudi, A. M., Ciaccio, M., Riccio, A. (1995). Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. *Free Radic Biol Med* 78(3), 401-409.
- Lippi, G., Franchini, M., Guidi, G.C. (2005). Cobalt chloride administration in athletes: a new perspective in blood doping? *Br J Sports Med*; 39(11):872-873.
- Lopez, J.L. y Legido, J.C. (1991). *Umbral Anaeróbico. Bases Fisiológicas y aplicaciones*. Madrid: Interamerica- McGraw- Hill, 63-67.
- Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M., Belcastro, A.N. (1987). Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 56(3), 313-316.
- Machlin, L. J., Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J* 7(6), 441-445.
- Mandl, J., Szarka, A., Bánhegyi, G. (2009). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol* 157(7), 1097- 1110.
- Manoharan, M., Schwille, P.O. (1994). Measurement of ascorbic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. Results in healthy subjects and patients with idiopathic calcium urolithiasis. *J Chromatogr B Biomed Appl* 654(1), 134-139.
- Maughan, R.J., Donnelly, A.E., Gleeson, M., Whiting, P.H., Walker, K.A., Clough, P.J. (1989). Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run. *Muscle Nerve* 12(A), 332-336.
- Margaritis, I., Palazzetti, S., Rousseau, A. S., Richard, M. J., Favier, A.

- (2003). Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *J Am Coll Nutr* 22(2), 147-156.
- Marzatico, F., Pansarasa, O., Bertorelli, L., Somenzini, L., Della Valle, G. (1997). Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long- distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sport Med Phys Fitness* 37, 235-239.
 - Mason, R.P. (1982). *Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance*. En Free radicals Biology, ed. Pryor WA. Academic Press, New York.
 - Maxwell, S.R., Jakeman, P., Thomason, H., Leguen, C., Thorpe, G.H. (1993). Changes in plasma antioxidant status during eccentric exercise and the effect of vitamin supplementation. *Free Radic Res Commun* 19(3), 191-202.
 - McBride, J.M., Kraemer, W.J., Triplett-McBride, T., Sebastianelli, W. (1998). Effect of resistance exercise on free radical production. *Med Sci Sports Exerc* 30, 67-72.
 - Meagher, E.A., FitzGerald, G.A. (2000). Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med* 28(12), 1745-1750.
 - Mena, P., Maynar, M., Gutierrez, J.M., Maynar, J., Timon, J., Campillo, J.E. (1991). Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. Adaptation to training. *Int J Sports Med* 12, 563-566.
 - Mitmesser, S.H., Giraud, D.W., Driskel, J.A. (2000). Dietary and Plasma Levels of Carotenoids, Vitamin E, and Vitamin C in a Group of Young and Middle- Aged Nonsupplemented Women and Men. *Nutr Res* 20(11), 1537-1546.

- Monboisse, J.C., Gardes-Albert, M., Randoux, A., Borel, J.P., Ferradini, C. (1988). Collagen degradation by superoxide anion in pulse and gamma radiolysis. *Biochim Biophys Acta* 965, 29-35.
- Morris, H. J., Carrillo, O., Almarales, A., Bermúdez, R. C., Lebeque, Y., Fontaine, R. (2007). Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 456-460.
- Muñoz, D., Olcina, G. J., Timón, R., Brazo, J., Robles, M. C., Maynar, M. (2010). Ejercicio físico y estrés oxidativo. *Revista Española de Educación Física y Deportes* 14, 93-107.
- Nasser, A., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M., & Ghasemi, Y. (2011). Single cell protein: Production and process. *American Journal of Food Technology*, 6(2), 103-116.
- Ngo, D. H.; Wijesekara, I.; Vo, T. S.; Ta, Q. V.; Kim, S. K. (2011). Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: an overview. *Food Res. Int.*, 44, 523-529.
- Nieman, D.C., Henson, D.A., McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., Morrow, J.D., Ahmed, A., Heward, C.B. (2004). Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship. *Med Sci Sports Exerc* 36(8), 1328-1335.
- Nless, A.M., Dickhuth, H.H., Northoff, H., Fehrenbach, E. (1999). Free radicals and oxidative stress in exercise-immunological aspects. *Exerc Immunol Rev* 5, 22-56.
- Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H., Gotoh, N. (1995). Interaction among

- vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 62, 1322S-1326S.
- Nikolaidis, M.G. y Jarmutas A.Z. (2009). Blood as a reactive species generator and redox status regulator during exercise. *Arch Biochem and Biophys* 490(2), 77-84.
 - Noberasco, G., Odetti, P., Boeri, D., Maiello, M., Adezati, L. (1991). Malondialdehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. *Biomed Pharmacother* 45, 193-196.
 - Oie, G., Reitan, K.I., Olsen, Y., (1994). Comparison of rotifer culture quality with yeast-plus oil and algal based diet cultivation diets. *Aquac. Int.* 2, 225–238.
 - Oie, G., Makridis, P., Reitan, K.I., Olsen, Y., (1997). Protein and carbon utilization of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 153, 103–122.
 - Olaizola, M. y Huntley, M. E. (2003): «Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae»; in Fingerman, M. y Nagabhushanam, R., eds.: *Recent advances in marine biotechnology. Biomaterials and bioprocessing* (9); Enfield, NH: Science Publishers. pp. 143-164.
 - Olcina, G., Munoz Marin, D., Timón, R., Caballero, M. J., Maynar, J., Cordova, A., Maynar, M. (2006). Effect of caffeine on oxidative stress during maximum incremental exercise. *J Sports Sci Med* 5, 621-628.
 - Olson, J.A. (1993). 1992 Atwater Lecture. The irresistible fascination of carotenoids and vitamin A. *Am J Clin Nutr* 57(6), 833-839.

- Orhan, H., van Holland, B., Krab, B., Moeken, J., Vermeulen, N.P., Hollander, P., Meerman, J.H. (2004). Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. *Free Radic Res* 38(12), 1269-1279.
- Ozhogina, O.A., Kasaikina, O.T. (1995). Beta-carotene as an interceptor of free radicals. *Free Radic Biol Med* 79(5), 575-581.
- Packer, L. (1997). Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci* 75(3), 353-363.
- Packer, L. (1984). Vitamin E, physical exercise and tissue damage in animals. *Med Biol* 62(2), 105-109.
- Palace, V.P., Khaper, N., Qin, Q., Singal, P.K. (1999). Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med* 26, 746-761.
- Palmer, F.M., Nieman, D.C., Henson, D.A., McAnulty, S.R., McAnulty, L., Swick, N.S., Utter, A.C., Vinci, D.M., Morrow, J.D. (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol* 89(1), 100-107.
- Papadopoulos, G.; Goulas, C.; Apostolaki, E. y Abril, R. (2002): «Effects of dietary supplements of algae containing polyunsaturated fatty acids, on milk yield and the composition of milk products in dairy ewes»; *J. Dairy. Res.* (69), pp. 357-365.
- Pincemail, J., Deby, C., Camus, G., Pirnay, F., Bouchez, R., Massaux, L., Goutier, R. (1988). Tocopherol mobilization during intensive exercise. *Eur*

J Appl Physiol Occup Physiol 57(2), 189-191.

- Powers, S.K., Lennon, S.L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58(4), 1025- 1033.
- Prior, R.L., Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 27(11-12), 1173-1181.
- Quintanilha, A.T., Packer, L. (1983). Vitamin E, physical exercise and tissue oxidative damage. *Ciba Found Symp* 101, 56-69.
- Radak, Z., Taylor, A.W., Ohno, H., Goto, S. (2001). Adaptation to exercise- induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev* 7, 90- 107.
- Ramel, A., Wagner, K.H., Elmadfa, I. (2004). Plasma antioxidant and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. *Eur J Nutr* 43(1), 2-6.
- Ramel, A., Wagner, K.H., Elmadfa, I. (2004a). Correlations between plasma noradrenaline concentrations, antioxidants, and neutrophil counts after sub- maximal resistance exercise in men. *Br J Sports Med* 38, E22.
- Rand, G. & S. Petrocelli. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology. Hemisphere Corporation, Washington, D.C. 665 p.
- Reilly, P.M., Bulkley, G.B. (1990). Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Br J Surg* 77, 1323-1324.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Oie, G., Olsen, Y., 1997. A review on the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* 155, 207–

221.

- Reynolds. CS (1991) Toxic blue-green algae, the 'problem' in perspective. *Freshwater Forum* 1: 29–38.
- Rimbach, G., Hohler, D., Fischer, A., Roy, S., Virgili, F., Pallauf, J., Packer, L. (1999). Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr* 52(3), 203-222.
- Robertson, J. D., Maughan, R. J., Duthie, G.G., Morrice, P.C. (1991). Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clin Sci* 80(6), 611-618.
- Rodriguez-Martinez, M.A., Garcia-Cohen, E.C., Briones, A., Baena, A.B., Marin, E., Salaices, M., Marin, J. (1999). Changes in plasma oxidative state with age and their influence on contractions elicited by noradrenaline in the rat tail artery. *Life Sci* 65,915-924.
- Rothman, K.J., Moore, L.L., Singer, M.R., Nguyen, U.S., Mannino, S., Milunsky, A. (1995). Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med* 333, 1369-1373.
- Rousseau, A.S., Hininger, I., Palazzetti, S., Faure, H., Roussel, A.M., Margaritis, I. (2004). Antioxidant vitamin status in high exposure to oxidative stress in competitive athletes. *Br J Nutr* 92(3), 461-468.
- Roynette, C. E.; Calder, P. C.; Dupertuis, Y. M. y Pichard, C. (2004): «n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention»; *Clin. Nutr.* (23); pp. 139-151.
- Satchek, J.M., Blumberg, J.B. (2001). *Role of vitamin E and oxidative stress in exercise.* *Nutrition* 17(10), 809-814.

- Salvesen, I., Skjermo, J., Vadstein, O., 1999. Growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) during first feeding in relation to the proportion of r/K strategists in the bacterial community of the rearing water. *Aquaculture* 175, 337–350.
- Sánchez, J. F.; Fernández-Sevilla, J. M.; Acién, F. G.; Cerón, M. C.; Pérez- Parra, J. y Molina-Grima, E. (2008): «Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: Influence of irradiance, dilution rate and temperature»; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (79); pp. 719-729.
- Santangelo, L., Cigliano, L., Montefusco, A., Spagnuolo, M.S., Nigro, G., Golino, P., Abrescia, P. (2003). Evaluation of the antioxidant response in the plasma of healthy or hypertensive subjects after short-term exercise. *J Hum Hypertens* 17, 791-798.
- Sastre, J., Asensi, M., Gaseo, E., Pallardo, F. V., Ferrero, J. A., Furukawa, T., Vina, J. (1992). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol* 263(5 Pt 2), R992-R995.
- Sauberlich, H.E. (1994). Pharmacology of vitamin C. *Annu Rev Nutr* 14, 371-391.
- Schieber, A. (2012). Functional foods and nutraceuticals. *Food Research International*, 46(2), 437.
- Schurks, M., Glynn, R.J., Rist, P.M., Tzourio, C., Kurth, T. (2010). Effects of vitamin E on stroke subtypes: meta- analysis of randomized controlled trials." *BMJ* 341, c5702.
- Sen, C.K. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling:

introduction. *Med Sci Sports Exerc* 33(3), 368-370.

- Sen, C.K., Rankinen, T., Vaisanen, S., Rauramaa, R. (1994). Oxidative stress after human exercise: effect of N-acetylcysteine supplementation. *J Appl Physiol* 76(6), 2570-2577.
- Senturk, U.K., Gunduz, F., Kuru, O., Kocer, G., Ozkaya, Y.G., Yesilkaya, A., Bor- Kucukatay, M., Uyuklu, M., Yalcin, O., Baskurt, O.K. (2005a). Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans. *J Appl Physiol* 99, 1434-1441.
- Senturk, U.K., Yalcin, O., Gunduz, F., Kuru, O., Meiselman, H.J., Baskurt, O.K. (2005b). Effect of antioxidant vitamin treatment on the time course of hematological and hemorheological alterations after an exhausting exercise episode in human subjects. *J Appl Physiol* 98, 1272-1279.
- Seo, T.; Blaner, W. S. y Deckelbaum, R. J. (2005): «Omega-3 fatty acids: molecular approaches to optimal biological outcomes»; *Curr Opin Lipidol* (16); pp. 11-18.
- Seyle, H. (1976). *Stress in health and disease*. Reading, MA: Butterworth.
- Seyle, H. (1976). *The Stress of Live* (rev.edn). New York: McGraw-Hill.
- Shahidi, F. y Miraliakbari, H. (2004): «Omega-3 (n-3) fatty acids in health and disease: Part I-Cardiovascular disease and cancer»; *J. Med. Food* (7); pp. 387-401.
- Sharman, I.M., Down, M. G., Sen, R.N. (1971). The effects of vitamin E and training on physiological function and athletic performance in adolescent swimmers. *Br J Nutr* 26(2), 265-276.
- Sheih, I. C.; Fang, T. J.; Wu, T. K.; Lin, P. H. (2010). Anticancer and

- antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein in waste. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1202–1207.
- Shephard, R.J., Campbell, R., Pimm, P., Stuart, D., Wright, G.R. (1974). Vitamin E, exercise, and the recovery from physical activity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 33(2), 119-126.
 - Shi, X. M.; Jiang, Y. y Chen, F. (2002): «High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture»; *Biotech. Prog.* 18(4); pp. 723-727.
 - Shigenaga, M.K., Gimeno, C.J., Ames, B.N. (1989). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (24), 9697-9701.
 - Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., Ames, B.N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10771-10778.
 - Shih, M. F., Chen, L. C., Cherng, J. Y. (2013). *Chlorella* 11-peptide inhibits the production of macrophage-induced adhesion molecules and reduces endothelin-1 expression and endothelial permeability. *Mar. Drugs*, 11 (10), 3861–3874.
 - Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215, 213-219.
 - Sies, H., Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sei* 311, 617-631.
 - Sies, H., Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 62, 1315S-1321S.

- Simon, J.A., Hudes, E.S. (2000). Serum ascorbic acid and gallbladder disease prevalence among US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Arch Intern Med* 160, 931-936.
- Spolaore, P., Joannis -Cassan, C., Duran, E. ylsambert A. (2006): «Commercial applications of microalgae»; *J. Biosci. Bioeng.* (101); pp. 87-97.
- Stadtman, E.R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220-1224.
- 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.
- Sumida, S., Tanaka, K., Kitao, H., Nakadomo, F. (1989). Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation. *Int J Biochem* 21(8), 835-838.
- Surmen-Gur, E., Ozturk, E., Gur, H., Punduk, Z., Tuncel, P. (1999). Effect of vitamin E supplementation on post-exercise plasma lipid peroxidation and blood antioxidant status in smokers: with special reference to haemoconcentration effect. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 79, 472-478.
- Tadros, M., P. Bulthia & W. Smith. 1990. Differential response of marine diatoms to trace metal. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 826-831.
- Tauler, P., Suredaa, A., Casesa, N., Aguiló, A., Rodríguez-Marroyoc, J., Villac, G., Tura, J., Ponsa, A. (2006). Increased lymphocyte antioxidant

defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. *The journal of nutritional biochemistry*. 17(10), 665-671.

- Thurman, H. V. (1997). *Introductory Oceanography*. New Jersey: Prentice Hall College. ISBN 0-13-262072-3.
- Udenigwe, C. C., Mohan, A. (2014). Mechanisms of food protein- derived antihypertensive peptides other than ACE inhibition. *J. Funct. Foods*. 8, 45–52.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Micol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39, 44– 84.
- Verdecchia, P.; Angeli, F.; Mazzotta, G.; Gentile, G.; Reboldi, G. (2008). The rennin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. *Vasc. Health Risk Manage*. 4, 971–981.
- Viguie, C.A., Frei, B., Shigenaga, M.K., Ames, B.N., Packer, L., Brooks, G.A. (1993). Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J Appl Physiol* 75, 566-572.
- Vina, J., Gimeno, A., Sastre, J., Desco, C., Asensi, M., Pallardo, F.V., Cuesta, A., Ferrero, J.A., Terada, L.S., Repine, J.E. (2000). Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life* 49, 539-544.
- Viinikka, L., Vuori, J., Ylikorkala, O. (1984). Lipid peroxides, prostacyclin, and thromboxane A2 in runners during acute exercise. *Med Sci Sports Exerc* 16(3), 275-277.

- Visviki, Y. & W. Rachlin. 1994. Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: Effects on ultrastructure. *Archv. Environ. Contam. Toxicol.* 26: 1554-1562
- Vollard, N.B., Shearman, J.P., Cooper, C.E. (2005). Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med* 35(12), 1045-1062.
- Vuorimaa, T., Vasankari, T., Mattila, K., Heinonen, O., Häkkinen, K., Rusko, H. (1999). Serum hormone and myocellular protein recovery after intermittent runs at the velocity associated with VO_2 max. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80, 575-581.
- Walsh, G., M. Yoder, L. Laughlin & E. Lores. 1987. Responses of marine unicellular algae to brominated organic compound in six growth media. *Ecotox. Envir. Safety* 14: 215-222.
- Weiss, L.W., Cureton, K.J., Thompson, F.N. (1983). Comparison of serum testosterone and androstenedione responses to weight lifting in men and women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 50, 413-419.
- Willmore, J.H., Costill, D.L. (2007). Fisiología del esfuerzo y del deporte (6a éd.). Barcelona: Paidotribo.
- Winston, G.W. (1990). Physiochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. *Louisiana State University, Baton Rouge*.
- Xiaodan, F., Lu, B., Liang, Z., Li, Y., Xuwu, Z. (2014). Marine Algae-Derived Bioactive Peptides for Human Nutrition and Health. *J. Agric. Food Chem.* 62, 9211–9222.
- Yalcin, O., Bor-Kucukatay, M., Senturk, U.K., Baskurt, O.K. (2000). Effects of swimming exercise on red blood cell rheology in trained and untrained

rats. *J Appl Physiol* 88, 2074-2080.

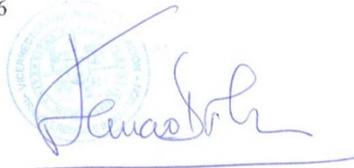
- Yongmanitchai, W. y Ward, O. P. (1989): «Omega-3 fatty acids: alternative sources of production»; *Process Biochem* (24); pp. 117-125.
- Zheng, L. H.; Wang, Y. J.; Sheng, J.; Wang, F.; Zheng, Y.; Lin, X. K.; Sun, M. (2011). Antitumor peptides from marine organisms. *Mar. Drugs*, 9 (10), 1840–1859.
- Zheng, L.; Lin, X.; Wu, N.; Liu, M.; Zheng, Y.; Sheng, J.; Ji, X.; Sun, M. (2013). Targeting cellular apoptotic pathway with peptides from marine organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1836 (1), 42–48.

ANEXOS

D. FERNANDO HENAO DAVILA, PRESIDENTE POR DELEGACIÓN DE LA COMISION DE BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA.

INFORMA: Que una vez analizada, por esta Comisión la solicitud de Proyecto de Investigación titulado “ Efectos de la ingsta de Tetraselmis Chuii sobre el estréx oxidativo en Deportistas“, cuyo Investigador Principal es D/Dª Javier Rodrigo Bellido, ha decidido por unanimidad valorar positivamente el proyecto por considerar que se ajusta a las normas éticas y de Bioseguridad esenciales cumpliendo con la normativa vigente al efecto.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo el presente informe en Badajoz a 6 de Septiembre de 2016



Fdo.: Fernando Henao Dávila
Presidente por Delegación de
Comisión de Bioética y Bioseguridad

INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Se le ha pedido que participe en esta investigación, el propósito de este documento es explicarle en qué consiste el estudio para que le ayude a tomar una decisión sobre la invitación para participar en el mismo. Antes de decidirse a participar, por favor, tome todo el tiempo que necesite para hacer todas las preguntas necesarias. Asimismo, siéntase con la libertad de hablar con cualquier persona, su familia, amigos, médico, o cualquier otro profesional de la salud.

Este proyecto de investigación estará desarrollado por el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Ciencias del Deporte, Departamento de Fisiología, que dirige el profesor y Doctor en Medicina y Cirugía D. Marcos Maynar Mariño. El proyecto está controlado por personal titulado y cualificado entre los que se encuentran Licenciados y Doctores en Ciencias de la Actividad Física y el Deporte, y un Doctor especialista en Medicina Deportiva.

Pedimos su colaboración para realizar las siguientes actividades:

Se le realizará un estudio antropométrico para calcular sus porcentajes de grasa y de masa muscular y una batería de test para valorar su condición física antes y después de la prueba de esfuerzo.

Le extraerán muestras de sangre antes de la prueba de esfuerzo y un mes después de la suplementación de tratamiento, se realizará el mismo protocolo, extracción de sangre y posteriormente la prueba de esfuerzo.

El objetivo que persigue el estudio es determinar qué efectos provoca la ingesta del suplemento de microalgas (Tetraselmis Chuii).

En caso de detectar, mediante las pruebas, cualquier tipo de incompatibilidad entre el evaluado y el programa de actividades, el equipo de evaluación le informaría y se suspenderían las pruebas o participaciones restantes.

La realización de este estudio no precisa la administración de ningún medicamento.

Beneficios, riesgos y molestias:

Usted no obtendrá ningún beneficio directo por participar en este estudio. Sin embargo, su participación en esta investigación puede ayudar al conocimiento de las propuestas planteadas.

Este estudio no debe ocasionarle riesgos ni molestias, salvo aquellos que pueden ser derivados de la práctica normal del ejercicio (cansancio, etc.).

Alternativas:

Usted tiene como alternativas participar o no en este estudio.

Revisión de documentos originales, confidencialidad y protección de datos personales.

Información y muestras codificadas.

Para proteger su confidencialidad, sus datos, su muestra y sus resultados estarán identificados con una

etiqueta en la que sólo aparecerá un código, pero no su nombre ni sus iniciales. A esto se le denomina “información codificada”. Únicamente el investigador principal guardará un archivo confidencial con la vinculación de este código con su nombre.

Almacenamiento de las muestras y análisis posteriores de las muestras.

En todo momento las muestras se almacenarán en un lugar seguro. Realizados los análisis las muestras serán almacenadas anonimadas, de tal manera que no podrá relacionarse con usted ni identificarse. En estas condiciones podría ser analizada en otros estudios o por otros investigadores con un proyecto aprobado por un Comité de Ética e Investigación o correspondiente, y siempre que se respeten los objetivos y principios establecidos en este documento.

Información personal y resultados

El consentimiento informado que firma para participar en esta investigación, se conservará en un archivo especial y seguro, separado de su historia y no forma parte de ella. Su nombre no aparecerá en ninguna publicación o informe acerca de esta investigación.

Su información médica y sus resultados de la investigación formarán parte de los medios que permitirá a los investigadores comprender la respuesta del organismo con el ejercicio físico. Su información y resultados se almacenarán en una base de datos electrónica de un ordenador. Se seguirá la normativa internacional que regula la información almacenada en ordenadores. Todas las previsiones legales sobre la confidencialidad y acceso a sus datos de carácter personal serán respetadas en este estudio y en los datos que de él se deriven.

Sus resultados son únicamente para la investigación y serán utilizados con ningún otro fin.

Aspectos comerciales

Usted no recibirá ninguna compensación económica por su participación en este estudio o derivada de sus resultados, registros o desarrollos de la investigación.

Participación voluntaria

La participación en este estudio es voluntaria, usted tiene las siguientes opciones; participar en este estudio, no participar en este estudio, y participar, pero luego cambiar de opinión y retirarse en cualquier momento. Tanto si opta por no participar desde el principio como retirarse más adelante, no tiene que dar ninguna explicación al respecto.

Si inicialmente decide participar en este estudio, pero luego opta por retirarse del mismo, su muestra codificada será destruida y solo se guardará la información ya obtenida hasta el momento. Sin embargo, una vez anonimada no será posible identificar su muestra y por tanto destruirla.

Persona contacto para el estudio.

Para cualquier duda sobre la investigación o sobre cualquier daño derivado de la participación en el estudio, puede contactar en cualquier momento con Javier Rodrigo Bellido (Teléfono: 605 24 82 65).

CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.

Yo, (Nombre y apellidos) DNI nº.....

He leído las hojas de la información (páginas 1-2) y he podido hacer preguntas sobre el estudio, y las realizadas han sido contestadas satisfactoriamente. Considero haber recibido suficiente información sobre el estudio y haber tenido tiempo suficiente para considerar de manera adecuada mi participación en el estudio.

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio, cuando quiera y sin tener que dar explicación alguna al respecto.

Al firmar este documento doy libremente mi conformidad de participar en el estudio anteriormente mencionado.

Fecha:...../...../.....

Firma del participante (manuscrita)

Firma del responsable del estudio

Teléfono de contacto..... Código.....