



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“Empleo de la Biomasa Residual de la Microalga,
Phaeodactylum tricornutum en la Formulación de una Bebida
Funcional”**

TESIS

Que presenta

IBQ. JENNIFER VIANEY FELIX MEDINA

Para Obtener el grado de

Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Directores

DR. ANGEL VALDEZ ORTIZ

DRA. LOURDES J. GERMÁN BAEZ

Culiacán, Sinaloa, México

Noviembre, 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 06 del mes Julio del año 2020, el (la) que suscribe Jennifer Vianey Félix Medina alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología con número de cuenta 53130790, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Ángel Valdez y cede los derechos del trabajo titulado "Empleo de la Biomasa Residual de la Microalga *Phaeodactylum tricorutum* en la Formulación de una Bebida Funcional", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jennifer", written over a horizontal line.

Jennifer Vianey Félix Medina

Nombre completo y firma

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	viii
I RESUMEN	9
ABSTRACT	11
II INTRODUCCIÓN	13
III REVISIÓN DE LITERATURA	15
A MICROALGAS	15
1 Generalidades	15
2 Composición bioquímica	16
3 Cultivo	19
4 Cosecha	24
5 Usos	27
6 Especies	29
a <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	32
B BIOCOMBUSTIBLES	34
1 Producción de biocombustibles a partir de microalgas	35
2 Biomasa residual	37
a Generalidades	37
b Composición bioquímica	38
c Usos	40
C ALIMENTOS FUNCIONALES	43

1	Generalidades	43
2	Antioxidantes en los alimentos	44
	a Biomoléculas con capacidad antioxidante	44
	1) Compuestos fenólicos	46
	2) Carotenoides	47
3	Bebidas funcionales	49
	a Generalidades	49
	b Clasificación y consumo	49
IV	JUSTIFICACIÓN	53
V	HIPÓTESIS	54
VI	OBJETIVOS	55
	A GENERAL	55
	B ESPECÍFICOS	55
VII	MATERIALES Y MÉTODOS	56
	A MATERIALES	56
	1 Material biológico	56
	B MÉTODOS	56
	1 Cultivo de microalgas	56
	2 Cinética de crecimiento	57
	3 Obtención de la biomasa microalgal BM	59
	a Floculación con quitosano	59
	b Centrifugación	62
	4 Obtención de la biomasa residual	62

a	Extracción de aceite	62
5	Composición química de la BM y BR de <i>P. tricornutum</i>	64
a	Humedad	64
b	Proteína cruda	64
c	Lípidos	64
d	Cenizas	65
e	Carbohidratos	65
f	Fibra dietaria total	65
1)	Insoluble	65
2)	Soluble	66
6	Propiedades nutraceuticas de la BM y BR	66
a	Obtención de extractos de fitoquímicos libres	66
1)	Etanólicos	66
2)	Metanólicos	68
b	Obtención de extractos de fitoquímicos ligados	68
1)	Etanólicos	68
2)	Metanólicos	69
c	Determinación de la capacidad antioxidante (CAox)	69
1)	Método ORAC	70
2)	Método ABTS	71
3)	Método DPPH	71
d	Determinación del contenido de fitoquímicos	72
1)	Compuestos fenólicos totales	72

2) Carotenoides totales	72
7 Propiedades fisicoquímicas de la BR de <i>P. tricornutum</i>	73
a pH	73
b Color	73
c Actividad de agua (a_w)	74
d Índice de solubilidad en agua (ISA)/ Índice de absorción de agua (IAA)	74
e Índice de dispersabilidad	75
8 Optimización de la formulacion para elaborar una bebida funcional	75
a Diseño experimental	75
b Evaluación de las variables de respuesta	76
1) Capacidad Antioxidante	76
2) Evaluación Sensorial	76
a) Elaboración de las bebidas	76
b) Análisis sensorial	76
c Análisis de varianza y regresión	78
d Optimización	80
9 Análisis de la formulación óptima y evaluación sensorial de la bebida funcional obtenida	81
a Composición química	81
b Contenido energético	81
c Determinación de la CAox por métodos ORAC, ABTS y DPPH	81
d Contenido de compuestos fenólicos	81

e	Evaluación sensorial	81
10	Análisis estadístico	82
VIII	RESULTADOS Y DISCUSIONES	83
A	CINETICA DE CRECIMIENTO	83
B	OBTENCIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL	86
1	Tratamientos de floculación	86
C	COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PROPIEDADES NUTRACEUTICAS DE LA BM	89
1	Composición química	89
2	Propiedades nutraceuticas	91
a	Capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales	91
b	Carotenoides totales	96
D	COMPOSICIÓN QUÍMICA, PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y NUTRACÉUTICAS LA BR	97
1	Composición química y propiedades fisicoquímicas	97
2	Capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos	103
E	FORMULACION ÓPTIMA PARA LA FORMULACIÓN DE UNA BEBIDA FUNCIONAL A BASE DE BR DE <i>P. tricornutum</i>	107
1	Modelos experimentales de predicción	107
a	Capacidad antioxidante (CAox)	109
b	Aceptabilidad (A) sensorial	111
2	Optimización	115
F	COMPOSICIÓN QUÍMICA, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y	

COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA FORMULACIÓN ÓPTIMA	118
G CONTENIDO NUTRIMENTAL Y ENERGETICO, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACEPTABILIDAD SENSORIAL DE LA BEBIDA FUNCIONAL OBTENIDA	121
IX CONCLUSIONES	127
X BIBLIOGRAFÍA	129
ABREVIATURAS	158

INDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág.
1	Sistemas de cultivos de microalgas	23
2	Métodos de cosecha de biomasa microalgal	25
3	Especies de microalgas	31
4	Producción integral de biocombustibles a partir de microalgas	36
5	Cálculo del numero celular utilizando hemocitómetro	58
6	Diagrama de proceso de floculación	61
7	Diagrama de flujo para obtención de la BR de <i>P. tricornutum</i>	63
8	Diagrama de flujo para la obtención de fitoquímicos	67
9	Diagrama de flujo para la elaboración de bebidas funcionales	77
10	“Caja negra” del modelo matemático	79
11	Curvas de crecimiento	84
12	Gráficos de superficie de respuesta y de contornos para CAox	112
13	Gráficos de superficie de respuesta y de contornos para aceptabilidad (A)	114
14	Gráficos de deseabilidades individuales (d_i) para cada una de las variables dependientes	116
15	Gráfico de contornos de deseabilidad global (D)	117

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Composición química de especies de microalgas.	18
2	Aplicaciones de compuestos bioactivos presentes en microalgas	30
3	Composición química de la biomasa residual de microalgas	39
4	Perfil de aminoácidos presentes en biomasa residual de especies de microalgas	40
5	Antioxidantes diéticos	45
6	Clasificación de bebidas	51
7	Resultados experimentales de eficiencia de floculación con quitosano	87
8	Composición química de la biomasa microalgal de <i>P. triornutum</i>	90
9	Capacidad antioxidante y contenido de fitoquímicos presentes en la biomasa microalgal de <i>P. triornutum</i> .	92
10	Composición química y propiedades fisicoquímicas de la biomasa residual de <i>P. triornutum</i> .	99
11	Capacidad antioxidante y contenido de fitoquímicos presentes en la biomasa residual de <i>P. triornutum</i> .	104
12	Diseño experimental	108
13	Coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos experimentales de predicción	110
14	Composición química, capacidad antioxidante y compuestos fitoquímicos presentes en la formulación optimizada FO.	119
15	Contenido nutrimental, capacidad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos, aporte calórico y aceptabilidad de la bebida elabora a partir de la FO	122

- 16 Contenido nutrimental, capacidad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos, aporte calórico y aceptabilidad de bebidas funcionales 125

I RESUMEN

Actualmente las microalgas son consideradas como una opción promisoriosa y fuente alternativa para la producción de biocombustibles de tercera generación, debido a que presentan mayor eficiencia fotosintética, acumulan entre 20 y 80% de triacilgliceridos (utilizados en la elaboración de diversos biocombustibles), además son más eficaces en la asimilación de CO₂ y otros nutrientes con respecto a las plantas, contribuyendo de manera importante a la disminución de la contaminación originada por los gases de efecto invernadero. Por ello, se están utilizando para producir una amplia gama de biocombustibles a partir tanto de biomasa microalgal (BM) como de biomasa residual (BR), esta última generada como subproducto de la extracción de aceite, la cual está siendo objeto de estudio con la finalidad de explotar de manera integral las capacidades desarrolladas por las mismas.

En tanto, la biotecnología en microalgas ha ganado relevancia en las últimas décadas desarrollando un sin número de usos comerciales en sectores tan diversos como el alimentario, farmacéutico, energético, sanitario y medioambiental. Destacando los estudios acerca de sus propiedades químicas y nutricionales, así como la presencia de compuestos relacionados con actividades biológicas en estas. Por lo que, las microalgas se han vuelto un componente atractivo en la dieta, mediante su incorporación en productos alimenticios. Sin embargo, una de las limitaciones actuales en su producción masiva es su alto costo. Por lo que algunos de los mayores retos en el desarrollo de procesos con

microalgas, consisten en seleccionar mejores cepas y establecer estrategias de cultivo para que se logre el máximo posible de productividad y al mismo tiempo rentabilidad. En este sentido, la investigación fue evaluar el potencial empleo de la BR de la microalga

Phaeodactylum tricornutum en la formulación de una bebida funcional.

La BR de *P. tricornutum* fue obtenida a partir de un proceso de extracción de aceite en conjunto con un proceso de secado convectivo, obteniendo la biomasa en polvo, misma que se empleó en la formulación de una bebida funcional de calidad nutricional/nutracéutica alta. Para obtener la formulación óptima (FO) de la bebida funcional se utilizó la metodología de superficie de respuesta, tomando como factores la concentración de biomasa residual y saborizante (CBR y CS, respectivamente), mientras que las variables de respuesta fueron capacidad antioxidante (CAox) y aceptabilidad (A) de las bebidas. Para obtener la formulación optimizada se buscó maximizar la CAox y A, utilizando CBR y CS dentro del rango del diseño experimental. La FO fue CBR 9.0 g y CS 2.31 g. Una porción de 300 mL de bebida nutracéutica preparada a partir FO aporta el 26.84% y 18.37% del requerimiento diario de proteína para niños y niñas de 1-3 y 4-8 años, respectivamente. Además, aporta entre el 34.35-57.25% de la ingesta diaria de antioxidantes recomendada. La bebida elaborada a partir de la **FO** tuvo una aceptabilidad sensorial de 48 y 55, el cual se encuentra entre “Me disgusta ligeramente” y “Me gusta ligeramente” en una escala hedónica de 11 puntos. Esta bebida funcional puede ser usada como una alternativa de bebidas con valor nutricional/nutracéutico, las cuales son ofrecidas ampliamente en el mercado.

ABSTRACT

Recently microalgae are considered a promising option and alternative source third generation biofuels, because they exhibit higher photosynthetic efficiency, build between 20 and 80% of triacylglycerols, are more effective in the assimilation of CO₂ and other nutrients with regard to plants, contributing significantly to the reduction of pollution caused by greenhouse gases and can be used to produce a wide range of biofuels manner. Therefore, they are using to produce a wide range of biofuels from both microalgal biomass (BM) and residual biomass (BR), the latter generated as a byproduct of oil extraction, which is being scrutinized by the in order to comprehensively exploit the capabilities developed by them. Adding that the microalgae biotechnology has gained prominence in recent decades due to the wide range derived from its ability to accumulate compounds of high value applications, developing a number of commercial uses in such diverse sectors such as food, pharmaceutical, energy, health and environmental. Highlighting chemical and nutritional properties present in microalgae have been similarly studied, and the presence of related compounds with biological activities. So that microalgae have become an attractive component in the diet, through its incorporation in food products, as well as offering interesting technological properties, provides health benefits. However one of the current limitations is the mass production of microalgae to meet

demand, which is still very high production cost. One of the biggest challenges in the development of processes with microalgae consist in selecting better species and establishing strategies for the maximum productivity and so be profitable in the process. The overall objective of this research was to realize the potential use of residual biomass from microalgae *Phaeodactylum tricornutum* on the formulation of a functional beverage. The residual biomass of *P. tricornutum* was obtained from an oil extraction process in assembly of a convective drying process, obtaining a biomass powder, potentially same as used in formulating a functional drink nutritional/nutraceutical quality high. For optimal formulation (FO) based on residual biomass and flavoring to produce a functional beverage with high antioxidant capacity and sensory acceptability the response surface methodology was used, taking as factors the concentration of residual biomass and flavoring (CBR and CS, respectively), the response variables were antioxidant capacity and acceptability of nutraceutical drinks. For the FO was sought maximize CAox and A, using CBR and CS within the range of experimental design. The optimized formulation was CBR 9.0 g y CS 2.31 g. A serving of 300 mL of functional beverage prepared from FO contributes 26.84% and 18.37% of the daily requirement of protein for children 1-3 and 4-8 years respectively. It also provides between 34.35-57.25% of the recommended daily intake of antioxidants. The drink made from the FO had a sensory acceptability of 48 and 55, which is between "Dislike slightly" and "Neither like, Nor dislike"; and "Neither like, Nor dislike" and "like slightly" respectively, in an 11 point hedonic scale. This functional beverage may be used as an alternative beverage

nutritional/nutraceutical as prepared with water, simple sugars, artificial flavors and colors, which are widely available on the market value.

II INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos autótrofos que crecen de manera similar a las plantas superiores, ya que son capaces de convertir la energía solar en energía química a través de la fotosíntesis. Una amplia gama de especies poseen grandes cantidades de aceite, por lo que han atraído la atención a nivel mundial como una opción promisoriosa y fuente alternativa en la producción de biocombustibles de tercera generación, debido a que presentan mayor eficiencia fotosintética, son más eficaces en la asimilación de CO₂ y otros nutrientes con respecto a las plantas, acumulan entre 20 y 80% de triacilglicéridos (Chisti 2011) contribuyendo de manera importante a reducir la contaminación originada por los gases de efecto invernadero (GEI) (Rosenberg y col 2008). Por otro lado, al no pertenecer a un cultivo alimentario, no interfieren con la producción de alimentos, forraje y otros productos, incluyendo que demandan menor consumo de agua renovable y pueden cultivarse en agua salada o salobre (Chisti 2007; Amaro y col 2011).

Asimismo, la biotecnología en microalgas ha ganado relevancia en las últimas décadas debido al amplio rango de aplicaciones derivado de su potencial para acumular compuestos de alto valor, desde producción de biomasa para la

alimentación, su empleo en acuicultura o su uso como biofertilizantes, hasta la obtención de productos de valor terapéutico o industrial (Raposo y col 2013). Las propiedades químicas y nutricionales presentes en las microalgas han sido estudiadas, destacando su alto contenido de fibra dietaria, proteínas, carbohidratos, minerales, vitaminas, junto con la presencia de compuestos relacionados con actividades biológicas, entre ellos una variedad de pigmentos como clorofila y carotenoides, incluyendo algunos polifenoles. Por tanto, la incorporación de estas en productos alimenticios se ha vuelto un atractivo componente en la dieta, que además de ofrecer propiedades tecnológicas interesantes, proporciona beneficios a la salud (Becker y col 2013; Cofrades 2013; Barba y col 2015).

Sin embargo, una de las limitaciones actuales es la producción masiva de microalgas para satisfacer la demanda, misma que es todavía de alto costo. Por lo que, algunos de los mayores retos en el desarrollo de procesos con microalgas, consisten en seleccionar mejores cepas y establecer estrategias de cultivo para que se logre el máximo posible de productividad y al mismo tiempo rentabilidad (Loera-Quezada y Olguín 2010; Guedes y col 2011a).

Bajo este contexto en el presente trabajo nos hemos planteado, evaluar el potencial empleo de la biomasa residual de la microalga, *Phaeodactylum tricorutum* en la formulación de una bebida funcional, misma que es generada como subproducto del proceso de extracción de aceite en microalgas utilizado para la producción de biocombustibles, favoreciendo la rentabilidad de dicho proceso.

III REVISION DE LITERATURA

A MICROALGAS

1 Generalidades

Las microalgas son organismos unicelulares microscópicos (2-200 μm), polifiléticos, su metabolismo puede ser autótrofo o heterótrofo ya que utiliza principalmente la energía proveniente del sol para crecer y multiplicarse, suelen ser eucariontes, aunque las cianobacterias procariontes son frecuentemente incluidas como microalgas (Koller y col 2012; Larkum y col 2012). Son denominadas talófitas, al carecer de tallos, raíces y su principal pigmento fotosintético es la clorofila (Brennan y Owende 2010). Son base de la cadena alimentaria en los sistemas acuáticos formando el fitoplancton (Satyanarayana y col 2011), aportan más del 50% de la productividad fotosintética primaria en la tierra y representan fábricas solares para un amplio rango de productos potencialmente benéficos (Milledge 2011). La fotosíntesis es un proceso que usa la energía de la luz solar junto con agua y dióxido de carbono para producir oxígeno y carbohidratos, y convierte la energía solar en energía química (Hosikian y col 2010).

Aunque el mecanismo fotosintético de estos microorganismos es similar al de las plantas superiores, son generalmente más eficientes convertidores de energía solar debido a su estructura celular simple, por lo que la acumulación de energía química después del proceso fotosintético no se desperdicia en la construcción de estructuras complejas, sino que se orienta a un uso más eficiente de formación de nuevas células (Dragone y col 2010; Satyanarayana y col 2011). Además, las células crecen en suspensión acuosa, esto les permite tener un acceso más eficiente al agua, CO₂ y otros nutrientes; presentando altas tasas de producción, adaptándose fácilmente a distintas condiciones ambientales (Chisti 2007).

Las microalgas también son capaces de fijar el CO₂ de manera eficiente a partir de diferentes fuentes, incluyendo la atmósfera, los gases de escape industriales, y las sales solubles de carbonato. La fijación de CO₂ de la atmósfera es probablemente el método más básico para disminuir la presencia de éste en el ambiente, y se basa en la transferencia de aire durante la fotosíntesis de las plantas en su ambiente de crecimiento, por tal motivo los gases de escape industriales tales como el gas de combustión (que contiene hasta un 15% de CO₂) proporciona una fuente rica de CO₂ para el cultivo de microalgas, y una ruta potencialmente más eficiente para la bio-fijación del CO₂ (Wang y col 2008).

Potencialmente con base a su composición bioquímica, las microalgas pueden proporcionar una larga lista de sustancias útiles como biohidrógeno y combustibles de hidrocarburos, pigmentos y colorantes, alimentos y piensos, biopolímeros, biofertilizantes, plaguicidas, productos nutracéuticos y compuestos

farmacológicos (Harun y col 2010; Raposo y col 2013). Además, las microalgas se pueden utilizar en el tratamiento de aguas residuales, biorremediación y detener la acumulación de dióxido de carbono en el medio ambiente (Park y Li 2012).

2 Composición bioquímica

La composición bioquímica y productividad de las microalgas depende en gran medida de las condiciones de cultivo, composición del medio y el perfil de nutrientes (cantidad y calidad) que permiten incrementar o inhibir el crecimiento mediante la optimización de factores como: el control de la concentración de nitrógeno, intensidad luminosa (donde debe tomarse en cuenta criterios como el fotoperiodo), temperatura, salinidad, pH, concentración de CO₂ y el método de cosecha (Sierra y col 2008; Brennan y Owende 2010; Koller y col 2012). Como las microalgas poseen estructuras sencillas su composición consiste básicamente en carbohidratos, proteínas y lípidos; así como una gran variedad de vitaminas (A, B1, B2, B6, C, y E) y elementos (yodo, potasio, hierro, magnesio, calcio, etc.) en diferentes proporciones dependiendo de la cepa que se esté analizando (Cuadro 1) (Satyanarayana y col 2011; Salazar-Pérez 2012).

Las microalgas tienen un alto contenido de proteínas, el cual puede variar de un 30 a un 65% de su peso seco (Becker 1988). Estas presentan funciones estructurales y metabólicas, como catalizadores para el crecimiento y metabolismo celular, proporcionan el andamiaje sobre el que las moléculas de clorofila se ensamblan en los complejos de recolección de luz de los cloroplastos; también las encontramos incrustadas en las membranas lipídicas, donde cumplen ambas funciones (Williams y Laurens 2010).

En cuanto a los carbohidratos, éstos se encuentran principalmente como almidón, glucosa y otros polisacáridos de alta digestibilidad (Satyanarayana y col 2011). Los carbohidratos tienen funciones tanto estructurales como metabólicas, y como los productos iniciales de la fotosíntesis, sirven como punto de partida para la síntesis de otros compuestos bioquímicos. Las diferentes clases de microalgas producen determinados tipos de polisacáridos. Por ejemplo, las algas verdes producen una cantidad mayor de almidón como acumulador de energía, similar a las plantas superiores (Van Den Hoek y col 1995).

El contenido de lípidos varía entre el 1 y el 70 %, pero bajo ciertas condiciones, algunas especies pueden alcanzar hasta un 90 % de su peso

Cuadro 1. Composición química de especies de microalgas

Especie	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)	Cenizas (%)	Referencia
<i>Chlorella sp.</i>	38-57	2-32	19-26	24	Becker 2004; Chisti 2007; Batista y col 2013
<i>Spirulina p.</i>	46-63	4-14.2	8-22.2	7.8	Becker 2004; Tibbetts y col 2015 _b
<i>N. granulate</i>	17.9-33.5	23.6-47.8	27.4-36.2	6.7-6.9	Tibbetts y col 2015 _b
<i>B. Braunii</i>	39-50.9	17.4-34.4	18.5-30.6	5.4-10.6	Tibbetts y col 2015 _b ; Toro y col 2013
<i>Chlorella vulgaris</i>	40.9-58	14-22	12-25.2	5.8-13.3	Tibbetts y col 2015 _b ; Sydney y col 2010
<i>P. tricornutum</i>	26.5-51	7.6-23	9.5-47	15.9-20.9	Guil-Guerrero 2004; Zhao y col 2014
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	27.2-29.4	11.4-22	36-40.5	10.3-33.5	Kim y col 2015; Sydney y col 2010

<i>Scenedesmus</i>	42.5-56.0	12-16.9	8-14	28.3	Becker 2004; Ramos-Suárez y col 2014
<i>Dunaliella salina</i>	38-57	6-12	7-32	9	Becker 2004; Vásquez-Suárez y col 2007
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	31.5-50.8	12.2-39.8	11.3-13.1	NR	Renaud y col 2002; Rodolfi y col 2009
<i>Tetraselmis s.</i>	11-45	9-32	6-52	7-16	Chini-Zittelli y col 2006; Chisti 2007
<i>Neochloris o</i>	30.1	15.4	37.8	16.7	Tibbetts y col 2015 _b

NR-No reportado

seco (Harun y col 2010; Guedes y col 2011). Los lípidos en las microalgas presentan funciones de reserva de energía (triacilgliceridos), así como de componentes estructurales (fosfolípidos y glicolípidos) de la célula. Las microalgas presentan una rápida adaptación a cambios ambientales, debido a la rapidez con que sintetizan y reciclan sus ácidos grasos para mantener siempre las características de su membrana (Williams y Laurens 2010).

3 Cultivo

Los requerimientos principales de un cultivo de microalgas son luz, CO₂, sales, minerales y agua (Liu y col 2011; Mata y col 2012). Los valores típicos encontrados en literatura de estos requerimientos son: rangos de temperatura de 16-27°C, valores de pH de 4-11, salinidades de 12-40 g L⁻¹ e intensidades de luz de 1000-10000 lux. Los parámetros óptimos, así como los rangos de tolerancia son específicos para cada especie, por ende, distintos factores pueden ser

interdependientes y un parámetro que es óptimo para un conjunto de especies no necesariamente lo es para otro (Sierra y col 2008).

Sin embargo, existen factores decisivos en el crecimiento y formación de productos, en función de la especie, son la cantidad y calidad de los nutrientes (incluyendo la importancia de CO₂ en el sistema de cultivo), el suministro de energía (el rango espectral y fotoperiodo son factores cruciales y deben ser optimizados para cada especie de microalga) e intensidad de luz, la cual es importante, pues su limitación desencadena las llamadas “reacciones negras” en las células. De igual forma la utilización de oxígeno molecular provocado por fotoinhibición o el uso de una excesiva irradiación con fotones; causando severos daños a las células. Adicionalmente, la salinidad (fuerza iónica y composición de iones en el medio de cultivo), valores de pH, turbulencia y temperatura, son parámetros decisivos en el crecimiento celular y formación de productos (Sierra y col 2008).

En general, las microalgas dependen para su crecimiento de un suministro de carbono y de una fuente luz para realizar fotosíntesis. Sin embargo, como respuesta a cambios en las condiciones ambientales, pueden poner en funcionamiento diversos tipos de metabolismo (autotrófico, heterotrófico y mixotrófico); las microalgas autótrofas requieren únicamente compuestos inorgánicos como el CO₂, sales y una fuente de energía lumínica para su crecimiento (Brennan y Owende 2010); mientras que las heterótroficas, requieren solo compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, en ausencia de luz (Huang y col 2010); y las mixotróficas utilizan carbono orgánico e inorgánico

como fuente de carbono y captan la energía de la luz y del carbono orgánico (Chen y col 2011).

Además de carbono en forma de CO₂, las microalgas requieren de nitrógeno, que se asocia con su metabolismo primario como principal regulador en el crecimiento y acumulación de lípidos (Rodolfi y col 2009). Especies de rápido crecimiento prefieren utilizar amoníaco en lugar de nitrato, el agotamiento parcial de nitrógeno está asociado a menores tasas de crecimiento y una mayor producción de lípidos en las microalgas, sintetizados como una reserva ante situaciones de estrés nutricional. El fósforo es el tercer nutriente más importante y debe ser añadido al medio en forma de fosfatos. Asimismo, de estos componentes, se añaden metales traza tales como Mg, Ca, Mn, Zn, Cu, y Mb, y vitaminas para una mayor productividad (Lardón y col 2009; Liu y col 2011; Mata y col 2012). Las variaciones de temperatura provocan cambios en la velocidad de crecimiento, en el contenido de lípidos y en la composición de los ácidos grasos en la célula, además de que los efectos son específicos para cada especie (Arias-Peñaranda y col 2013). La agitación de los cultivos es necesaria para evitar la sedimentación celular, asegurara su exposición uniforme a la luz y nutrientes, además favorece el intercambio de gases entre el cultivo y el medio externo. Un mezclado inadecuado, reduce la productividad de biomasa y puede ocurrir muerte celular y fermentación del cultivo (Koller y col 2009).

El cultivo de microalgas se puede llevar a cabo mediante diversas estrategias de operación: discontinuo o *batch* (por lotes), semicontinuo o *fed-batch* y continuo, caracterizados por la forma en que el sustrato es alimentado al tanque (Lodi y col 2005). Se ha demostrado que en un cultivo *continuo* se puede

alcanzar altas tasas de productividad, lograr un equilibrio en la cinética de crecimiento donde la biomasa y los productos son producidos continuamente en cantidad y calidad constante. No obstante, su instalación y manejo es difícil, al igual que los costos de producción inicial (Atlic y col 2011; Tang y col 2012). En un cultivo *discontinuo* o *batch* las microalgas se cultivan en un recipiente con una concentración inicial, sin que esta sea alterada por nutrientes adicionales, por lo que el volumen permanece constante y solo las condiciones ambientales del medio (pH, temperatura, velocidad de agitación, etc.) son controladas por el operador. El proceso finaliza cuando el sustrato es consumido. Esta forma de cultivo es simple y se utiliza extensamente tanto en laboratorio como a escala industrial (Koller y col 2012). Por otro lado, está el cultivo *semicontinuo* o *fed-bach*, aquel donde los nutrientes son alimentados al biorreactor de forma continua o semicontinua, mientras que no hay efluente en el sistema. Según sea el objetivo de la operación, la adición intermitente del sustrato mejora la fermentación manteniendo baja la concentración del sustrato. Sin embargo, se ha estudiado que este tipo de proceso está restringido por la capacidad volumétrica del reactor, por lo que su duración es impredecible, y algas no deseadas, depredadores o contaminantes y metabolitos se acumulan con el tiempo, volviendo un cultivo inadecuado para su posterior uso (Salazar-Pérez 2012).

Uno de los principales obstáculos para la productividad continua en el cultivo de microalgas es la presencia de contaminantes biológicos capaces de eliminar un gran número de células en cuestión de días o incluso horas. Sin embargo, una serie de estrategias se están utilizando para combatir y prevenir la contaminación

en el cultivo de microalgas. Estas estrategias incluyen el uso de condiciones extremas en los medios de cultivo, tales como alta salinidad, pH elevados y una alta concentración de sustrato, para crear un ambiente desfavorable para los organismos competitivos o depredadores de las microalgas (Bacellar-Vermelho 2013; Koller y col 2012).

Los sistemas de producción de microalgas se dividen en dos tipos (Figura 1): sistemas abiertos (lagunas de estabilización, contenedores) y sistemas cerrados (tanque tipo fermentador, fotobiorreactores tubulares y laminares). En los sistemas abiertos es importante determinar el material de construcción, controlar la turbulencia, la dirección de flujo y tener la mayor superficie de contacto posible con la luz solar, ya que el cultivo está en contacto directo con el ambiente; mientras que en los sistemas cerrados debe considerarse el diseño del sistema, control de temperatura, tipo y duración de iluminación, así como la carga inicial del



Figura 1. Sistemas de cultivo de microalgas. a) Fotobiorreactor tubular; b) Fotobiorreactor tubular; c) Vertical; d) Fotobiorreactor tipo placa y e) Lagunas abiertas (LA) también conocidas como “raceway”. Tomado de Loera-Quezada y Olguín (2010)

del sistema (Pulz y Gross 2004; Koller y col 2009). Los principales sistemas de cultivo de microalgas son los fotobiorreactores abiertos o cerrados Raceway, estos sistemas pueden ser iluminados por luz artificial, solar o ambas (Loera-Quezada y Olgúin 2010). Diversos fotobiorreactores cerrados han sido estudiados debido a que permiten tener mayor control sobre las condiciones de cultivo que los sistemas abiertos, y se han obtenido mayores productividades de biomasa al mismo tiempo que se previenen agentes contaminantes (Bacellar-Vermelho 2013; Koller y col 2012).

Sin embargo, el costo de producción de biomasa en fotobiorreactores cerrados es de un orden de magnitud más alto que en sistemas abiertos; donde a pesar de obtener mayor concentración celular y productividad que en los sistemas cerrados no se compensa el costo del producto final por los altos costos de construcción y operación (Mata y col 2010). El cultivo de microalgas es un aspecto de interés comercial en la biotecnología moderna, donde uno de los mayores obstáculos en el procesamiento es la cosecha.

4 Cosecha

La creciente demanda por biomasa de microalgas ha desencadenado que el cultivo intensivo de éstas requiera aún del perfeccionamiento de algunas etapas claves como la cosecha. En este sentido, se han estudiado diversos métodos de cosecha (Figura 2) como la centrifugación, formación de biopelículas, filtración, sedimentación por gravedad, y la floculación (Salim y col 2011; Liu y col 2014; Barros y col 2015), siendo este último el de menor costo, lo que puede hacer el proceso más efectivo y conveniente por tanto ha sido ampliamente utilizado en la industria (Vandamme y col 2010).

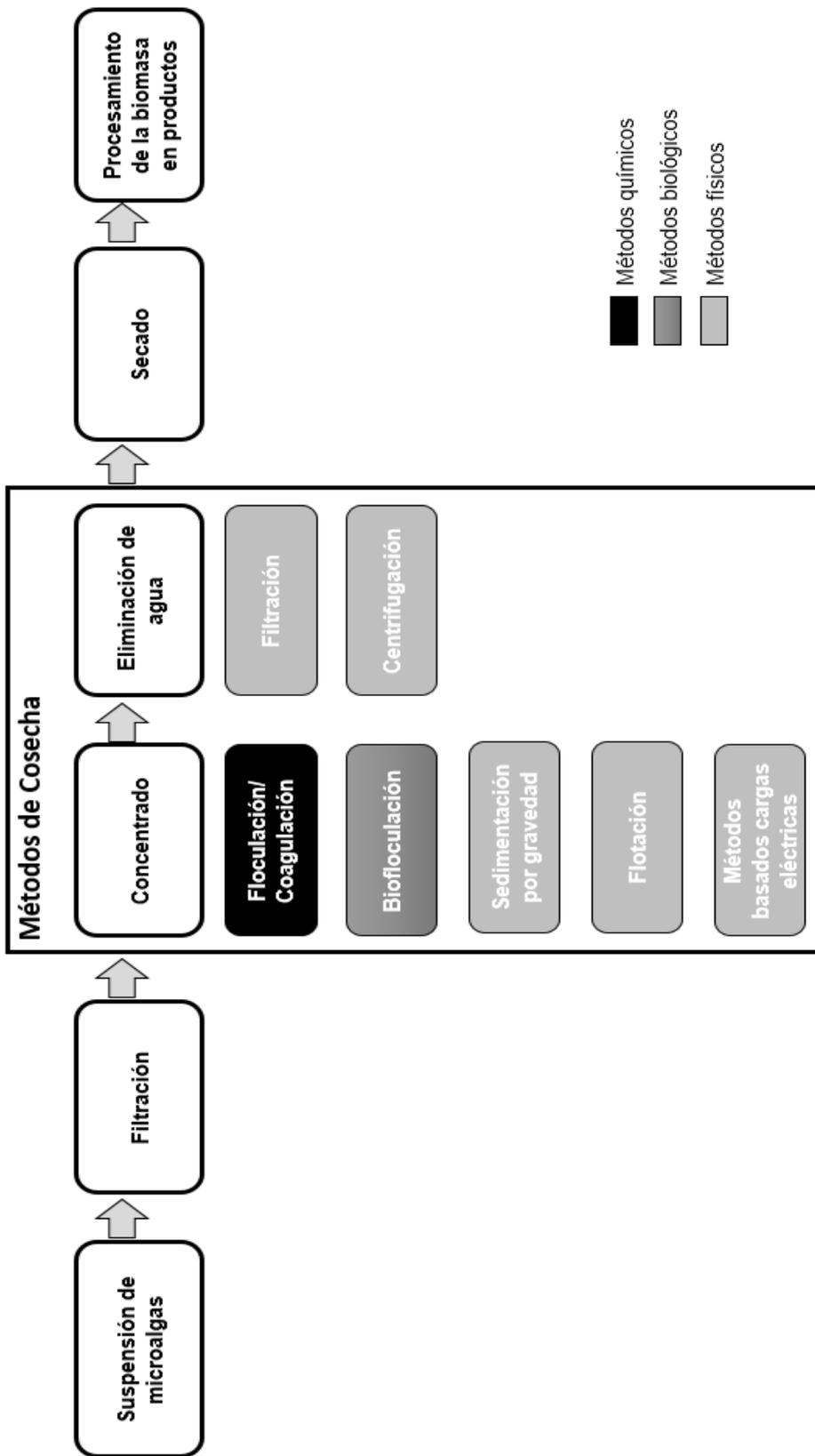


Figura 2. Métodos de cosecha de biomasa microalgal. Tomada de Barros y col (2015)

La floculación es el resultado de la colisión de partículas y la interacción entre el agente floculante y la superficie de la célula en un medio líquido. El mecanismo de floculación depende del tipo y tamaño de célula, así como el tipo de floculante empleado. Numerosos coagulantes químicos o floculantes han sido citados (Papazi y col 2010; Gerde y col 2014), dentro de los principales floculantes destacan los de naturaleza inorgánica como el cloruro y sulfato de aluminio, así como cloruro férrico, mismos que han sido preferidos por ofrecer altos índices de eficiencia en la cosecha de microalgas, sin embargo, se ha demostrado que éstos liberan partículas residuales en la biomasa, limitando su potencial empleo en la industria alimentaria. Una alternativa importante ha sido el empleo de floculantes orgánicos, que se encuentran naturalmente disponibles, son biodegradables y de menor costo, siendo uno de los más utilizados el quitosano (Knuckey y col 2006; Vandamme y col 2010; Anthony y col 2013).

El quitosano es un bio-floculante que puede ser encontrado en hongos y obtenido por la desacetilación de la quitina la cual es un componente del exoesqueleto de los crustáceos. La quitina es un abundante polímero natural que puede ser utilizado en el proceso de floculación (Yu y Chen 2009). El quitosano es una solución interesante ante el manejo y costos operacionales de la biomasa microalgal, ya que en comparación de los floculantes inorgánicos resulta no ser tóxico, de un costo menor, al no requerir tratamientos de depuración posteriores, además de ser de fácil manejo (Renault y col 2009; Ahmad y col 2011). Por otro

lado, se ha reportado que el ajuste de pH a niveles alcalinos promueve la precipitación y aumenta la eficiencia de floculación substancialmente, al inducir que las cargas de la superficie celular desaparezcan gradualmente (punto de neutralización) acelerando su sedimentación (Knuckey y col 2006; Sirín y col 2012; Liu y col 2014), para lo cual se ha hecho uso de algunas sales como: hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, entre otras (Chen y col 2011).

El resultado de la cosecha de microalgas por este método, es una biomasa húmeda, la cual puede ser directamente empleada en la industria alimenticia y/o energética, entre otros (Raposo y col 2013; Barba y col 2015). Misma que puede ser secada y obtener así una sustancia pulverizada muy fina, donde la coloración depende exclusivamente de la microalga y de las condiciones de cultivo a las que haya sido sometida.

5 Usos

Actualmente la biotecnología en microalgas ha desarrollado un sin número de aplicaciones comerciales con estas, en sectores como el alimentario, energético, farmacéutico, sanitario y medioambiental (Harun y col 2010; Guedes y col 2014a). Recientemente las microalgas están siendo utilizadas como aditivos en alimentos para la nutrición humana, como suplementos nutracéuticos, ya que son una buena fuente de compuestos con altas propiedades nutricionales, contienen cantidades significativas de macronutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos), aminoácidos esenciales y no esenciales, clorofila, carotenoides, polifenoles, polisacáridos, minerales y pigmentos (Bishop y Zubeck 2012; Barba y col 2015). Estos últimos tienen la peculiaridad de ser específicos en cada especie, y se han

encontrado diferentes aplicaciones destacando las relacionadas con el cuidado de la piel, así como la elaboración de cosméticos y exfoliantes (Priyadarshani y Rath 2012; Shukla y Dhar 2013).

Las microalgas pueden ser usadas para aumentar el valor nutricional de alimentos tanto en la nutrición humana como animal debido a su valiosa composición química. Por ello uno de los usos más antiguos y significativos sin duda ha sido en la acuicultura al ser empleadas como alimento vivo para especies marinas (Guedes y Malcata 2011; Santos-Ballardos y col 2015b). Incluyendo que el contenido de lípidos de microalgas es utilizado en la elaboración de aceites vegetales, mientras que el porcentaje mayor se utiliza en biocombustibles, se ha reportado que ciertas microalgas poseen un alto potencial en la producción de biodiesel, por su capacidad para acumular lípidos (en forma de triacilgliceridos) de manera intracelular bajo condiciones de estrés y por la facilidad de su cultivo en sistema continuo (Koller y col 2012; Larkum y col 2012). En cualquier caso, los factores ambientales, el tipo de cosecha y el método de secado de las células determinan la cantidad de sustancias potencialmente útiles en las microalgas (Satyanarayana y col 2011).

Adicionalmente, las microalgas tienen aplicación como biofertilizantes y su uso se ha extendido al tratamiento de aguas residuales para eliminar contaminantes químicos como nitritos, nitratos, fósforo, metales pesados (Cr^{+3} , Cd^{+2} , Cu^{+2} y otros) y contaminantes orgánicos como hidrocarburos aromáticos, fenoles y disolventes orgánicos, además de eliminar los patógenos del agua residual (Metha y Gaur 2005; Brennan y Owende 2010; Rawat y col 2011). Y adicionalmente se comprobó la capacidad de la microalga *N. oculata* ST-3 de

biodegradar el formaldehído, un compuesto severamente tóxico para la piel, ojos y sistema respiratorio (Yoshida y col 2009).

Algunas investigaciones han desarrollado alimentos funcionales, a partir de las microalgas, elaborando alimentos tradicionales como mayonesas, aderezos (Gouveia y col 2006), pudines, postres (Batista y col 2012), así como galletas (Gouveia y col 2008) y pasta (Frandique y col 2010), enriquecidos con biomasa de diferentes especies de microalgas, añadiendo colorantes y atributos funcionales, haciendo los productos más atractivos sensorialmente y ofreciendo posibles beneficios a la salud (Batista y col 2013).

Por otra parte, se ha demostrado que ciertas especies de microalgas producen diferentes compuestos con actividad antibacteriana, antiviral, anticarcinogénica, antioxidante y antifúngica, mismos que podrían tener aplicación en el área de la salud, como lo son: los ácidos poliinsaturados, pigmentos, proteínas y otra gran cantidad de sustancias (Cuadro 2) (Rodríguez-Meizoso 2010; Raposo y col 2013). Tal es el caso de *P. triornutum* microalga en la que se encontró un potencial comercial de extracto de fucoxantina, con gran poder antioxidante (Kim y col 2012; Xia y col 2013). Hosikian y col en el 2010 reportaron que en la microalga *T. suecica* uno de los compuestos bioactivos más destacables que pueden ser extraídos de la biomasa de esta microalga es la clorofila, que presenta interesantes aplicaciones como colorante natural con propiedades antioxidantes y antimutagénicas.

Hasta ahora, la aplicación más significativa de los compuestos bioactivos presentes en las microalgas se centra en el sector alimentario, debido a su

capacidad de disminuir la formación de radicales libres de las células y tejidos en el organismo humano (Ulloa y col 2011).

6 Especies de microalgas

En la actualidad se reportan más de 300, 000 especies de microalgas, su diversidad es superior a las plantas superiores (Scott y col 2010), y se distinguen por su amplio rango de coloraciones (Figura 3) (doradas, verde-azules, rojas,

Cuadro 2. Aplicaciones de compuestos bioactivos presentes en microalgas

	Compuestos bioactivos	Actividad	Aplicaciones
Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)	Ácido eicosapentaenoico (EPA)	Nutracéutica; antimicrobiana; anti-inflamatoria	Suplementos alimenticios
	Ácido araquidónico (ARA)	Vasoconstructiva	Terapéuticas; ingrediente saludable
	Ácido Docosahexaenoico (DHA)	Nutracéutica	Nutracéuticas; alimentos para bebe
Esteroles	Estigmasterol	Hipocolesterolemica	Alimento para especies marinas
Pigmentos	Ficocianina	Pigmento natural; anti-inflamatoria y antioxidante	Suplemento alimenticio
	Astaxantina	Pigmento natural; anti-inflamatorio; fuerte antioxidante; suplemento	Tratamiento para el dolor muscular
	β- caroteno	Pigmento natural; pro-vitamina A y antioxidante	Suplemento alimenticio; farmacéuticas
Proteínas/ enzimas	Luteína, zeaxantina	Antioxidante	Farmacéuticas
	Proteínas		Suplemento alimenticio
Vitaminas	Superoxido dismutasa (SOD)	Antioxidante; anti-inflamatoria	Suplemento alimenticio; terapéuticas
	Vitamina C, K; vitaminas B ₁₂ , A y E; α-tocoferol	Antioxidante; mecanismo de coagulación de sangre	Sistema inmune
Otros	Ácido (GABA)	Neurotransmisor;	Regulación del

Ácido Okadaico	antifúngica; anti- inflamatoria	sistema nervioso central
Ciguatoxina	Antifúngica	Terapéuticas
	Antifúngica	Farmacéuticos

Adaptado de Raposo y col 2013

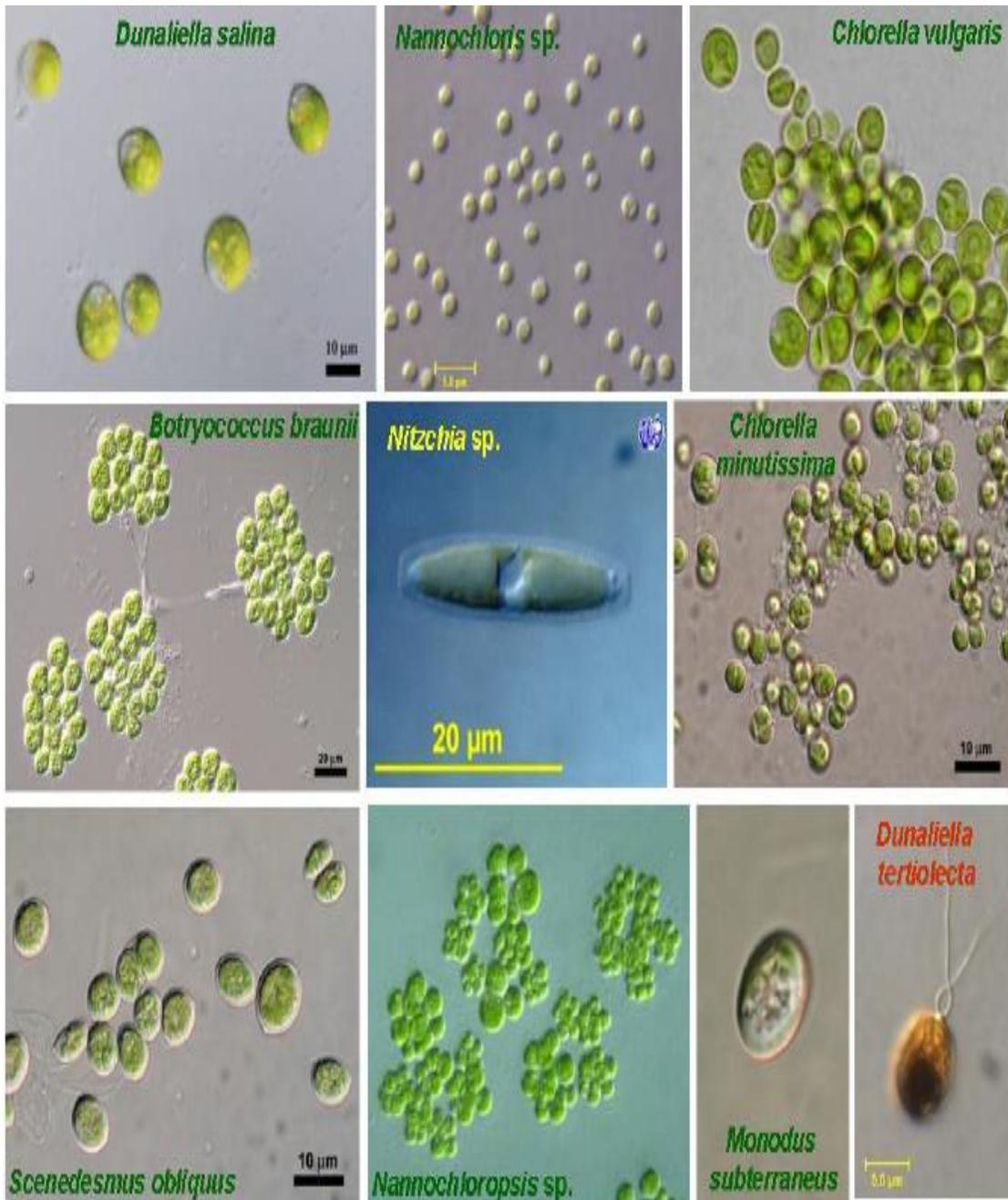


Figura 3. Especies de microalgas. Adaptado (Ben-Amotz 2009)

pardas, verdes, amarillas) (Alam y col 2012). Generalmente, las microalgas se han clasificado de acuerdo esta característica, la cual sigue siendo de cierta importancia. Sin embargo, los actuales sistemas de clasificación se basan en criterios como: tipo de pigmentos, naturaleza química de los productos de almacenamiento y componentes de su pared celular (Dragone y col 2010; Nigam y Singh 2011). Otros criterios que se suelen tomar en cuenta en su clasificación son los caracteres citológicos y morfológicos que poseen. Cabe mencionar que hay dos tipos básicos de microalgas, de tipo procariota o eucariota (Lee 2008). Las microalgas procariontes se clasifican en dos divisiones: Cyanofhyta y Prochlorophyta y eucariontes en nueve: Glaucophyta, Rodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta y Chlorophyta (Mutanda y col 2011).

Actualmente los estudios se han centrado en microalgas eucariotas al ser las principales productoras de alimentos del ecosistema marino, ya que es donde se encuentra la principal reserva de alimentos y fuente renovadora del oxígeno de la atmosfera terrestre (Rizzi J. 2010), algunas de las especies más utilizadas en acuicultura, y que en los últimos años han llamado la atención en la producción de biocombustibles son: *Chlorella*, *Dunalliella spp*, *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira*, *Nannochloropsis*, *Chaetoceros*, *Phaeodactylum tricornutum* (Guedes y col 2014a; Sun y col 2014).

a *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum es una microalga unicelular que mide cerca de 3 µm de ancho y de 8 a 20 µm de largo, contiene un solo plástido. Distinta de otras diatomeas, puede existir en diferentes morfotipos (fusiforme, trirradiado y oval)

(Borowitzka y Volcani 1978). Las formas fusiformes y triradiales son comunes cuando crecen en medio líquido y las formas ovales cuando crecen en el medio con agar. Dicha plasticidad está relacionada a la forma natural atípica de su pared celular, siendo pobre solo en sílice comparado con otras diatomeas. *P. tricornutum* es la única especie que no es está obligada a tener ácido de sílice como requerimiento para su crecimiento, por tanto, las formas ovoide, fusiforme y triradiadas son morfotipos que se presentan cuando se sintetizan ya sea en presencia o ausencia de ácido de sílice (Francius y col 2008).

Taxonomía *Phaeodactylum tricornutum*

Dominio: *Eukaryota*

Reino: *Protoctista / Chromista*

Filo: *Bacillariophyta*

Clase: *Bacillariophyceae*

Orden: *Naviculales*

Familia: *Phaeodactylaceae*

Género: *Phaeodactylum*

Especie: *P. tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum es una microalga que está siendo considerada en los últimos años, es una de las pocas especies que ha sido secuenciado su genoma (Bowler y col 2008) lo que aumenta su facilidad a ser modificada genéticamente y así obtener compuestos específicos de interés, lo que abre un nicho de oportunidades en diversas vertientes pues ha despertado un peculiar interés, ya que además de jugar un papel importante en el rol de los ecosistemas y biodiversidad acuáticos, presenta tasas de productividad altas, puede acumular

de un 30-45% de ácidos grasos poliinsaturados, siendo capaz de acumular hasta un 40% de ácido eicopentanoico (EPA), se han relacionado con potenciales terapéuticos, así como actividad antibacterial (Desbois y col 2009; Pérez-López y col 2014). Adicionalmente *P. tricornutum* se está utilizando en la generación de bioenergía (Rawat y col 2013); y es considerada su aplicación en la industria alimenticia, como alimento y/o ingrediente funcional (Guedes y col 2014a).

B BIOCOMBUSTIBLES

Actualmente, la creciente demanda energética mundial, el agotamiento y el elevado costo de los combustibles fósiles, sumados a la preocupación por el impacto ambiental en especial a los graves perjuicios ambientales por emisión de dióxido de carbono (CO₂) ha motivado el resurgimiento del interés de los especialistas por buscar alternativas energéticas que permitan disminuir sus emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y ampliar su matriz energética, concentrando gran parte de sus esfuerzos en la producción de combustibles y/o energía de origen renovable como: solar, fotovoltaica, eólica, térmica, hidroeléctrica, geotérmica, biocombustibles, entre otras. En este escenario los biocombustibles resultan ser una alternativa energética promisorio de los combustibles fósiles (Chisti 2007; Balat 2011; Alam y col 2012).

Los biocombustibles se refieren a los combustibles sólidos, líquidos o gaseosos derivados o producidos a partir de materia orgánica. Para lograr una sustentabilidad económica y ambiental, se requiere que el proceso de producción de biocombustibles no sólo sea renovable, sino que también contribuya al secuestro de CO₂ atmosférico (Chisti 2011). Debido a esto las mejores alternativas parecen ser los biocombustibles de tercera generación, es decir,

aquellos que contribuyen en la reducción del uso de tierra ya que no requieren tierras cultivables y no son empleados para consumo humano. Dentro de esta categoría se encuentran algunos microbios y ciertas especies de microalgas (Mata y col 2010).

1 Producción de biocombustibles a partir de microalgas

En las últimas décadas se ha destacado que las microalgas representan una alternativa más conveniente que cualquier otro tipo de organismo para la producción de lípidos, los cuales son necesarios en la producción de algunos biocombustibles, ya que algunas microalgas, al ser organismos fotosintéticos, sólo requieren energía solar, agua, CO₂ y algunas sales para producir muy altos rendimientos de biomasa rica en lípidos (Li y col 2008). Algunas microalgas doblan su biomasa en 24 h y el tiempo de duplicación de biomasa durante la fase exponencial puede ser tan corto como 3.5 h. Además, una característica importante es que no ponen en riesgo la seguridad alimentaria al no competir ni por agua ni tierra de cultivo, pues son capaces de crecer en ambientes salinos (Chisti 2007). Por tanto, la biomasa de microalgas se ha utilizado como materia prima para la producción de una variedad de distintos biocombustibles, por ejemplo: bioetanol, biodiesel, biogás, biohidrógeno (Figura 4) (Chisti 2007; Mata y col 2010).

Desafortunadamente existen algunos parámetros claves que afectan la factibilidad económica de la producción de biocombustibles a partir de microalgas los cuales son: la productividad de la biomasa microalgal, el contenido celular de lípidos y, sobre todo, la productividad de lípidos. Este último parámetro determina

el costo del proceso de cultivo, mientras que la concentración de la biomasa en el cultivo y el contenido celular de los lípidos, afectan significativamente el costo de

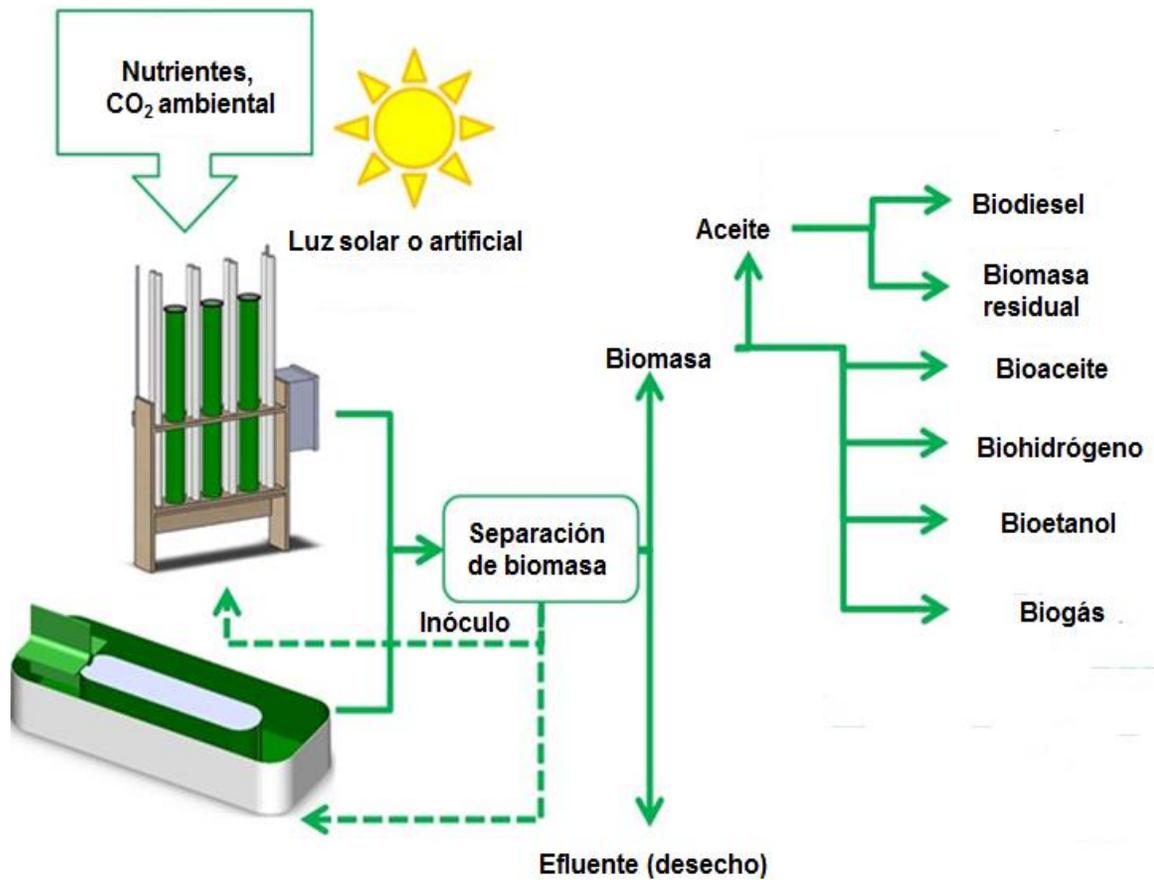


Figura 4. Producción integral de biocombustibles a partir de microalgas.

Adaptado (Rawat y col 2013)

los procesos de extracción y transformación. Por lo tanto, un proceso ideal debería permitir la producción de lípidos a la más alta productividad celular, con el contenido más alto posible en las células (Li y col 2008). Sin embargo, los costos de producción de biocombustibles a partir de microalgas pueden ser reducidos substancialmente haciendo uso de la biorefinería misma que se fundamenta en la innovación de estrategias que permitan el mejoramiento de las capacidades de las microalgas, lo cual puede lograrse a través de herramientas tales como la ingeniería genética y avances en ingeniería de fotobiorreactores (Chisti 2007; Alam y col 2012).

El objetivo de la biorefinería es utilizar cada componente de la biomasa de la materia cruda para producir productos útiles, de esta forma, se utiliza 100% de la biomasa microalgal (BM), así el costo total de producción de cualquiera de los productos será menor comparado con otros, obteniendo un proceso rentable. En este sentido, una alternativa es dar uso a la biomasa residual BR (Loera-Quezada y Olgún 2010; Tibbetts y col 2014).

2 Biomasa residual

a Generalidades

Durante el proceso de extracción a gran escala de lípidos y otros compuestos de alto valor presentes en las microalgas se producen grandes cantidades de residuos orgánicos, mismos que se han denominado como biomasa residual (BR), la cual podría recibir apropiados tratamientos para su posterior aplicación (Williams y Laurens 2010; Ramos-Suarez y col 2014). Se ha demostrando que la

BR conserva interesantes contenidos de proteínas, carbohidratos y otros nutrientes, los cuales podrían ser utilizados en la nutrición tanto humana como animal (Lee y col 2013; Norzagaray-Valenzuela 2015; Tibbetts y col 2015b).

Además, la biomasa residual podría conservar otros compuestos de interés como aminoácido, pigmentos, vitaminas, minerales, ácidos grasos, azúcares y otros. Por tanto, la composición de la BR abre un panorama favorable en el uso de esta en la elaboración de productos alimenticios proporcionando de igual forma compuestos de alto valor, haciendo que el proceso de elaboración de biocombustibles a través de microalgas sea rentable (Chacón-Lee y col 2010; Becker y col 2013; Hudeck y col 2014)

b Composición bioquímica

La composición de la BR de microalgas normalmente se han indicado con respecto a las proteínas, lípidos, cenizas y carbohidratos presentes, y en algunas pocas hasta el momento se analizado su contenido de fibra, dichos valores son claves para establecer su posible uso y mismos que varían según la especie, condiciones de procesamiento (cultivo y cosecha de la microalga), así como el método de extracción de aceite empleado (Ehizae y col 2009; Williams y Laurens 2010; Hudeck y col 2013). Comportamiento que ha sido reportado, en el Cuadro 3 se muestra el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos, cenizas y fibra de BR de diferentes especies de microalgas, donde se observa de manera general, que proteínas y carbohidratos se encuentran como componentes mayoritarios.

Recientes investigaciones muestran que la BR conserva gran cantidad de los componentes presentes en la BM, observándose la presencia de carotenoides como luteína; del mismo modo se observó presencia tanto de aminoácidos

esenciales como no esenciales (Cuadro 4); presentando también ácidos grasos entre los que destacan el ácido oleico (33-47 %), ácido linólico (13-25 %) y

Cuadro 3. Composición química de la biomasa residual de microalgas

Microalga	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)	Carbohidratos (%)	Fibra (%)	Referencia
<i>Chlorella sp.</i>	50.4-64.1	0.1-3.1	ND	22.5-39.6	ND	Ehizae y col 2009; Li y col 2013
<i>Nannochloropsis granulata</i>	33.9-44.5	25.6	8.62	16.5	ND	Tibbetts y col 2015 _a ; 2015 _b
<i>B. Braunii</i>	48-52.1	4	21.1	22.6	4.4	Toro y col 2013; Tibbetts y col 2015 _b
<i>Chlorella vulgaris</i>	17.3	31.8	2.7	33.6	13.5	Tibbetts y col 2014
<i>Tetracytis sp.</i>	21.9	9.4	2.7	43.2	40.2	Tibbetts y col 2014
<i>Nannochloropsis bacillaris</i>	22.2	6.7	2.8	43.9	41.3	
<i>M. reisseri</i>	18.2	27.7	2.6	35.7	11.4	Tibbetts y col 2014
<i>P. tricornutum</i>	32.5- 42.9	6.2	17	44.38	ND	Zhao y col 2014; Tibbetts y col 2015 _b
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	35	NP	13.1	51.9	ND	Kim y col 2015; Norzagaray-valenzuela 2015
<i>Scenedesmus</i>	35.6	6.5	28.5	29.3	ND	Ramos-Suarez y col 2014
<i>N. salina</i>	47.9	14.16	ND	4.1	ND	Park y Li 2012
<i>Spirulina</i>	59.9	ND	ND	ND	ND	Tibbetts y col 2015 _b

<i>Tetraselmis chuii</i>	50.5	ND	ND	ND	ND
<i>Neochloris</i>	33.3	ND	ND	ND	ND

ND- No determinado. NP- No presente

Cuadro 4. Perfil de aminoácidos presentes en BR de especies de microalgas

	Biomasa residual de microalgas					Requerimientos para niños mayores de 3 años, adolescentes y adultos
	<i>C. vulgaris</i>	<i>M. reisseri</i>	<i>N. bacillarris</i>	<i>Tetracystis sp.</i>	<i>N. granulata</i>	
AAE						
Arginina	6.5	6.2	5.9	6.4	7.6	5.8
Histidina	2.1	1.9	1.8	1.6	2.3	1.7
Isoleucina	4.3	4.5	5.3	4.8	5.2	3.0
Leucina	9.2	9.6	9.5	8.9	9.5	6.1
Lisina	6.3	7.9	6.3	6.2	6.4	4.8
Metionina	2.4	0.3	0.3	1.9	2.6	2.2
Fenilalanina	5.6	5.7	6.6	6.6	5.6	2.8
Treonina	4.4	4.5	5.1	5.0	5.3	2.5
Triptófano	1.6	1.8	1.1	3.3	0.1	0.66
Valina	6.2	6.6	6.8	6.2	6.5	4.0
AAE índice	0.92	0.90	0.86	1.02	0.9	--
AANE						
Ác. Aspártico	17.4	15.8	25.1	21.3	37.4	--
Alanina	14.5	15.3	17.7	17.9	24.5	--
Cisteína	3.3	2.5	3.4	4.6	2.9	--
Ác. Glutámico	20.2	18.5	25.9	24.9	42.6	--
Glicina	11.2	11.2	13.9	14.1	19.6	--
Hidroxiprolina	0.9	1.1	0.4	0.4	0.1	--
Ornitina	ND	ND	0.2	0.2	1.4	--
Prolina	10.0	10.3	11.9	12.2	28.9	--
Serina	9.7	9.2	11.5	11.7	16.0	--
Taurina	1.0	1.1	0.9	2.1	0.3	--
Tirosina	7.9	7.3	8.7	9.3	14.4	--
Σ AANE	97.1	93.0	120.0	119.1	189.6	--
Σ AA	188.5	182.1	233.1	243.0	363.9	--

AAE- Aminoácidos esenciales. AANE- Aminoácidos no esenciales. ND- No detectado. Los valores de AAE fueron expresados en (g/100g de proteína); los valores de AANE fueron expresados en mg/g de muestra, bs. Requerimientos de

aminoácidos (g/100g de proteína), para niños mayores de 3 años, adolescentes y adultos según la FAO (2013). Tomado de Tibbetts y col (2014; 2015a).

ácido palmítico (14-20%); representando aproximadamente el 77% del total de ácidos grasos; además se reportó que los ácidos grasos poliinsaturados se encontraron de (PUFAs; 27-40%); así como la presencia de minerales como: Ca, Mg, P, K (Tibbetts y col 2014).

Adicionalmente, se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos de interés en BR tales como: fenol, 4-etil-fenol, 4-metil-fenol, 3-metil-indol, benceno propano nitrilo, bencil nitrilo, entre otros, compuestos identificados espectrofotométricamente a través de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), mismos que podrían estar relacionados con posibles actividades biológicas (Kim y col 2015).

Estudios mencionados demuestran que la BR pudiera ser utilizada como fuente atractiva de compuestos bioactivos, proponiendo su aplicación en diversos sectores de la vida humana.

c Usos

La BR antes descrita, podría considerarse fuente de metabolitos como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, ácidos grasos, azúcares, además de compuestos bioactivos como carotenoides y compuestos fenólicos entre otros, mismos que podrían ser empleados en áreas de salud, como aditivos en alimentos, tanto en nutrición humana como animal (Hudek y col 2014).

Desafortunadamente las investigaciones hasta el momento acerca de la aplicación de la BR con fines nutracéuticos son escasas, pues el mayor auge sin

duda alguna ha sido en la elaboración de biocombustibles tales como: biodiesel, bioetanol, biogás (metano y CO₂), biohidrógeno, entre otros, aprovechando en mayor medida los carbohidratos y azúcares presentes en esta, a través de técnicas

como: acidogénesis (Lee y col 2013; Li y col 2013) sacarización (Kim y col 2015); digestión anaeróbica (Sialve y col 2009; Zhao y col 2014) y co-digestión anaeróbica (Ramos-Suarez y col 2014; Santos-Ballardo y col 2015a).

Toro y colaboradores en el 2013, utilizaron BR de microalga *Scenedesmus*, para elaborar compositos biodegradables (bioplásticos) que podrían ser empleados en la agricultura, evitando el daño de los suelos, además de resultar de un costo menor que aquellos derivados del petróleo, ofreciendo mayores ventajas.

Sin embargo y a pesar de esto, la BR ha resultado ser rica en proteínas y carbohidratos, mostrando ser una alternativa para la formulación de alimentos funcionales, mismos que podrían adquirir una alta comercialización y competir con alimentos elaborados a base de otros cereales; pues aunado a eso la BR presenta 7 de 10 aminoácidos esenciales tales como: Triptófano, Metionina, Lisina, Valina, Leucina, entre otros. Recordando que generalmente otras fuentes de alimentación carecen de estos, por tanto, podría ser una fuente atractiva de estos compuestos, enriqueciendo diversos alimentos (Edgard y col 2012; Toro y col 2013; Ramos-Suarez y col 2014; Tibbetts y col 2014; 2015a).

En este sentido se han empleado los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) presentes en microalgas como aditivos a leches infantiles y ser utilizados para producir huevos enriquecidos con Omega-3, así mismo con base a las

investigaciones antes mencionadas, se han propuesto el uso de los PUFA presentes en la BR para enriquecer estos productos (Brennan y Owende 2010; Tibbetts 2014). Tomando en cuenta que los PUFA han sido relacionados con actividades antiinflamatorias (Raposo y col 2013). Se ha sugerido que la incorporación de pequeñas cantidades de BR en alimentos destinados a la alimentación de animales puede ayudar a mejorar su crecimiento, esto con base a la composición de elementos traza y minerales que presenta, destacando la presencia de Fe, el cual es un elemento traza esencial en la nutrición de animales y peces, ya que esta mayormente involucrado en la respiración celular, transporte de oxígeno, así como en el metabolismo de energía (Burja y col 2008; Tibbetts y col 2014; Kim y col 2014).

Adicionalmente se ha reportado que la BR conserva pigmentos de interés comercial como carotenoides y clorofila, mismos que han sido asociados con posibles actividades biológicas. Por tanto, podrían ser empleados como ingrediente en la elaboración de colorantes naturales y cosméticos (Becker 2013; Tibbetts y col 2015a). El potencial de la BR descubierto hasta el momento sugiere a esta biomasa como posible fuente para producir alimentos funcionales y subproductos de alto valor agregado como ingrediente nutracéutico, existiendo un nicho de oportunidades de mercado aun no explorado en la actualidad (Edgard y col 2012; Borowitzka 2013).

C ALIMENTOS FUNCIONALES

1 Generalidades

Las tendencias mundiales en la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia alimentos que, además de valor

nutritivo, aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano (Paulo y Serra 2000).

El término alimento funcional se propuso por primera vez en Japón en la década de los 80's con la publicación de la Reglamentación para los Alimentos para Uso Específico de la Salud (FOSHU= Foods for specified health use) y se refiere a aquellos alimentos procesados que contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su contenido nutrimental. El mecanismo de acción de estos consiste en su involucramiento o participación en la regulación o modulación manifestada en algún sistema biológico en general (Palencia 2002).

Por ello, los alimentos funcionales han tenido un fuerte impacto en los mercados mundiales en la última década y han ganado rápidamente cuota de mercado en productos de valor agregado, en la búsqueda de prevenir enfermedades crónico-degenerativas como la hipertensión, diferentes tipos de cáncer, entre otras; al ser alimentos en los cuales su o sus componentes (nutracéuticos) se han asociado con posibles actividades biológicas, las cuales están directamente relacionadas con la presencia de compuestos bioactivos como antioxidantes (Corbo y col 2014).

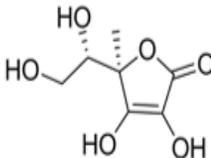
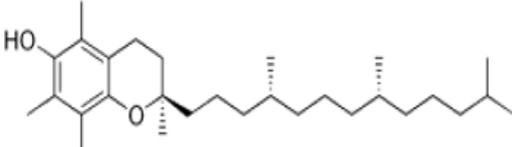
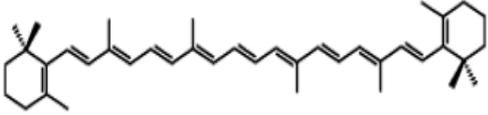
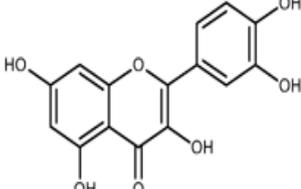
2 Antioxidantes de los alimentos

a Biomoléculas con capacidad antioxidante

Los antioxidantes son moléculas capaces de neutralizar los radicales libres por medio de la donación de un electrón. Un compuesto antioxidante puede definirse como un compuesto que puede donar fácilmente un electrón o un átomo de hidrogeno a un radical peróxido o alcoholóxido para terminar una reacción

peroxilípídica en cadena o para regenerar un compuesto, o puede quelar efectivamente un metal prooxidante. En el Cuadro 5 se muestran las formulas químicas de los principales antioxidante diéticos. Se debe considerar que la sustancia debe poseer unas características de hidrofília/lipofília que le permitan acceder al lugar donde debe prevenir la oxidación (Pannala y col 1998). Además

Cuadro 5. Antioxidantes diéticos

Antioxidante	Estructura
Ácido Ascórbico	
α-tocoferol	
β-caroteno	
Polifenol (flavonol)	

Tomada de García-Parrilla (2008).

de esta definición cabe considerar el concepto de antioxidante como aquella sustancia que es capaz de contrarrestar los aspectos de deterioro que la oxidación ocasiona en tejidos biológicos (Huang y col 2005). Se ha demostrado que los antioxidantes, en pequeñas cantidades, pueden prevenir o retardar la oxidación de materiales fácilmente oxidables como los lípidos y otras moléculas (Halliwell 1990). Esto atiende con mayor fidelidad las implicaciones que para la salud tienen los antioxidantes que pudieran estar presentes en los alimentos. Los productos alimenticios a base de biomasa microalgal son una excelente fuente de antioxidantes naturales (Hajimahmoodi y col 2010), ya que las microalgas durante el proceso fotosintético, absorben la energía solar para convertirla en energía química que después se usará en la conversión del CO₂ a carbohidratos, generando al mismo tiempo oxígeno molecular, el cual puede alcanzar altas concentraciones (Rodríguez-García y Guil-Guerrero 2008; Mutanda y col 2011). Para evitar el posible efecto perjudicial de este tipo de compuestos las microalgas han desarrollado un mecanismo de protección que consiste en sintetizar compuestos y enzimas antioxidantes, tales como pigmentos (carotenoides, clorofila), los cuales se han añadido en suplementos alimenticios ofreciendo esta posible actividad (Becker y col 2013).

Además, las microalgas sometidas a estrés inducido por las condiciones ambientales, desarrollan un proceso de defensa contra los radicales libres que consiste en mecanismos preventivos, mecanismo reparador, defensas físicas y defensas antioxidantes.

1) Compuestos fenólicos

Bajo el termino de compuestos fenólicos o polifenólicos se encuentran englobados varios de miles de compuestos de estructura química diversa que tienen en común poseer un anillo aromático de benceno con uno o varios sustituyentes de hidroxilo en él. Se clasifican en función del esqueleto carbono y de los sustituyentes del anillo en los siguientes grupos (i) Ácido ferúlico; (ii) C6-C1; (iii) C6-C3; (iv) Flavonoides; (v) Flavonoles; (vi) Flavonas; (vii) Flavonoles; (viii) Estilbenos; (ix) Lignanos (Dimitrios 2006).

Los compuestos fenólicos se han descrito como moléculas con actividad antioxidante que ejercen beneficios a la salud a través de diversas actividades biológicas, como antiinflamatoria y anticancerígena, que se encuentran relacionadas con la actividad antioxidante, ya que son capaces de disminuir las concentraciones de oxígeno o interceptar el oxígeno singulete. Los compuestos fenólicos tales como flavonoides, ácidos fenólicos y taninos son considerados como mayores contribuyentes a la capacidad antioxidante en plantas (Xu y Chang 2007).

Por otro lado, se ha reportado la presencia de ciertos tipos de flavonoides tanto en microalgas como en cianobacterias (Klejdus y col 2010), donde la presencia de estos a sido correlacionada con su actividad antioxidante (Wang y col 2008).

2) Carotenoides

Los carotenoides son compuestos que muestran coloración estable, por lo que han sido ampliamente estudiados en la industria alimentaria. Algunas de sus importantes propiedades físicas y químicas son: capturar el oxígeno singulete, absorber luz, isomerizar y oxidar fácilmente, bloquear reacciones por radicales libres, ser lipofílicos e insolubles en agua y finalmente, unirse a superficies hidrofóbicas (Handelman 2001). Su presencia en la dieta humana es considerada positiva por las propiedades biológicas que presentan: β -caroteno por su acción como pro-vitamina, y otros como Ficocianina, Astaxantina, Luteína por su capacidad antioxidante y anti-inflamatoria, así como ser agentes inhibidores de tumores (Raposo y col 2013).

Los más importantes son β -caroteno, licopeno, β -criptoxantina y luteína (Buzzini 2001). Los carotenoides se les puede encontrar en plantas, animales (en su forma trans), en microorganismos como microalgas, así como en la biomasa residual de microalgas (Edgard y col 2012; Tibbetts y col 2014).

Los pigmentos de carotenoides juegan una función importante en la fotosíntesis y fotoprotección de las microalgas. El papel de fotoprotección es originado por su habilidad para apagar e inactivar las especies de oxígeno (oxígeno singulete) formados por la exposición a la luz y al aire. Este papel también es asociado con la capacidad antioxidante en los humanos. Los carotenoides pueden reaccionar con los radicales libres y convertirse en radicales estables. Su actividad depende de la longitud de la cadena de dobles enlaces conjugados y las características de sus grupos finales. Los radicales de carotenoides son estables por la virtud de la deslocalización de los electrones no

apareados sobre la cadena conjugada de polieno de las moléculas. En concentraciones suficientes los carotenoides pueden prevenir la oxidación lipídica y la oxidación relacionada con el estrés oxidativo evitando de esta manera la aparición de diversas enfermedades crónico-degenerativas: fotocarcinogénesis, enfermedades cardiovasculares y arterioesclerosis (Lim 2006).

3 Bebidas funcionales

a Generalidades

Las bebidas se definen como todos aquellos líquidos que ingieren los seres humanos, incluida el agua. Sin embargo, se excluyeron productos líquidos para el reemplazo de comidas usados en el control de peso y las sopas. Se prescindió de estas últimas porque se comportan más como los alimentos sólidos que como líquidos, en términos de saciedad y compensación dietética (Rivera y col 2008).

Entre los alimentos funcionales se encuentran las bebidas funcionales, las cuales aportan beneficios a la salud por encima de los valores nutritivos simples atribuidos al producto convencional. Las bebidas funcionales son las bebidas que se han mejorado con ingredientes añadidos para proporcionar beneficios específicos a la salud más allá de la nutrición general. Estas se han vuelto tan populares que están desplazando en ventas a las bebidas gaseosas. Los consumidores buscan beneficios para su salud en los alimentos y bebidas, por tanto, dichas bebidas se ajustan correctamente al ámbito de la salud en el mercado, pues tanto la conveniencia y la salud han sido identificados como factores importantes en la toma de decisiones de los consumidores sobre la compra de alimentos y bebidas. Se han promovido bebidas funcionales con

beneficios tales como salud del corazón, inmunidad y el mejoramiento de la digestión, las articulaciones, sensación de saciedad, y la energía (ADA 2009).

b Clasificación y consumo

Actualmente existen en el mercado bebidas para deportistas (con sales y minerales, isotónicas, con fibra y/o soya) y enriquecidas (vitaminas, oligosacáridos, β -caroteno, etc.) para disminuir el nivel de colesterol en la sangre y prevenir enfermedades crónico-degenerativas (Shahidi y Weerasinghe 2004). Considerando los beneficios y riesgos para la salud y nutrición, así como el patrón de consumo de las bebidas en México, el Comité clasificó las bebidas en seis categorías de acuerdo con su contenido energético, valor nutritivo y riesgos a la salud en una escala que clasifica las bebidas de la más (nivel 1) a la menos (nivel 6) saludable (Cuadro 6), lamentablemente las bebidas funcionales no se han tomado en cuenta hasta el día de hoy en la actual clasificación; aunque su consumo se ha sido enfatizado, todo ello por los grandes beneficios que ofrecen por encima de las bebidas, aunado al interés de los consumidores por mantener una vida saludable (Popkin y col 2006; Rivera y col 2008).

Sin embargo, en la categoría de alimentos funcionales, las bebidas funcionales son el segmento de más rápido crecimiento, éstas principalmente son elaboradas a base de leche, frutas, verduras y cereales que aportan beneficios a la salud por encima de los valores nutritivos simples atribuidos al producto convencional (Corbo y col 2014; Reyes-Moreno y col 2014). Estudios actuales en bebidas están centrados en las áreas asociadas a la salud e imagen, se han desarrollado productos para el control del peso, el desarrollo de masa muscular, la reducción de grasa corporal, la prevención y combate de caries, e incluso la

belleza de piel y el cabello (Sepúlveda 2013). Además, recientes investigaciones indican que la incorporación de microalgas en bebidas presenta una buena oportunidad para popularizar los beneficios en la salud de estas, incluso quienes no están acostumbrados a este alimento. Por ello, en los últimos años han incorporado las microalgas en diferentes bebidas, ofreciendo la diversificación de productos, así como la participación de una posición en los mercados emergentes con un **Cuadro 6. Clasificación de bebidas**

Nivel	Bebida
1	Agua potable
2	Leche baja en grasa (1%) y sin grasa; bebidas de soya sin azúcar adicionada
3	Café y té sin azúcar
4	Bebidas no calóricas con edulcorantes artificiales (café, té y refrescos de dieta)
5	Bebidas con alto valor calórico y beneficios a la salud limitados: jugos de frutas, leche entera, bebidas alcohólicas, bebidas para deportistas y alcohol combinado con bebidas energéticas y/o refrescos
6	Bebidas con azúcar y contenido bajo de nutrimentos (refrescos, jugos, aguas frescas y café con azúcar)

Nivel 1- Más saludable. Nivel 6- Menos saludable. Tomado de Popkin y col (2006); Rivera y col (2008).

futuro muy prometedor (Cofrades 2013).

Por tanto, las bebidas funcionales son consideradas ya una oportunidad de negocio que cubre un nicho de mercado, aquel generado por el interés de los consumidores ante la necesidad de mantener una buena salud y/o reducir el riesgo de padecer enfermedades, encontrado en las bebidas funcionales el diseño de alimentos más saludables capaces de influir en las funciones corporales, además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas (Sepúlveda 2013; Corbo y col 2014).

IV JUSTIFICACIÓN

Debido al incremento en la demanda de productos funcionales y al interés en el desarrollo de nuevas fuentes que reduzcan la contaminación a nivel mundial. La biomasa residual generada como subproducto en la elaboración de ciertos biocombustibles a partir de microalgas, podría tener un empleo potencial en el desarrollo de nuevos productos con valor agregado en la alimentación y salud, con elevada calidad nutricional/nutracéutica, por su alto contenido de compuestos bioactivos; favoreciendo con esto la rentabilidad del empleo de microalgas como fuente renovable y sustentable de energía.

V HIPÓTESIS

El empleo de la biomasa residual de la microalga *P. tricornutum* en la formulación de una bebida funcional es una alternativa de alimento con valor agregado en la salud, pues posee buenas propiedades nutricionales, fisicoquímicas y nutracéuticas.

VI OBJETIVOS

A GENERAL

Evaluar el empleo de la biomasa residual de la microalga *phaeodactylum tricornutum*, en la formulación de una bebida funcional.

B ESPECIFICOS

- 1 Obtener la biomasa microalgal (BM) y residual (BR) de la microalga *Phaeodactylum tricornutum*.
- 2 Caracterizar química, fisicoquímica y nutracéuticamente la biomasa, BM y BR, producida a partir de la microalga *P. tricornutum*.
- 3 Optimizar la formulación de una bebida funcional a partir de la BR, con base a la A y CAox de la misma.
- 4 Evaluar el contenido nutrimental de la formulación óptima y de la bebida obtenida, así como su contenido energético.
- 5 Evaluar las propiedades nutracéuticas y contenido de fitoquímicos de la formulación óptima, así como la aceptabilidad de la bebida obtenida a partir de la formulación optima.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. El proyecto consistió en evaluar el potencial empleo de biomasa residual de la microalga *P. tricornutum*, obtenida a partir de la extracción de aceite.

A MATERIALES

1 Material Biológico

La especie de microalga evaluada fue, *Phaeodactylum tricornutum* la cual fue obtenida de la colección de microalgas del departamento de acuicultura del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE).

B MÉTODOS

1 Cultivo de microalgas

La microalga fue cultivada utilizando el medio F/2 reportado por Guillard y Rhyter (1962), el cual se compone de sal de mar 34%, vitaminas, fosfatos, nitratos y metales traza. Se empleó la técnica de transferencias sucesivas, partiendo de una cepa almacenada en un tubo de ensayo con aproximadamente

10 mL se inoculó un matraz con 250 mL de medio de cultivo, así sucesivamente hasta alcanzar un volumen de 16 L.

Una vez inoculado, se mantuvieron condiciones de luz, temperatura y aireación constantes; la temperatura se mantuvo a 24 ± 2 °C, empleando un equipo de refrigeración/calefacción, se procuró que todas las células se encontraran expuestas a la misma cantidad de luz, la cual fue emitida durante 24 h al día con una intensidad de 6000-6500 luxes, que es equivalente a un flujo de fotones de aproximadamente $210\text{-}130 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La aireación fue suministrada al cultivo de forma continua con un soplador de 2.5 hp de potencia, previamente filtrado con un cartucho de $1\mu\text{m}$. La aireación facilitó el intercambio de gases y permitió mantener las microalgas en suspensión.

2 Cinética de crecimiento

Para establecer la cinética de crecimiento se tomaron muestras del cultivo cada 24 h y se realizaron mediciones mediante conteo celular y densidad óptica, con el fin de conocer la concentración de la biomasa, se utilizó la metodología propuesta por Santos-Ballardo y col (2015b). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Los conteos se realizaron empleando un microscopio compuesto (OLYMPUS CX21) equipado con hematocímetro de 0.1 mm de profundidad (cámara de recuento celular Neubauer), la cual está dividida en nueve cuadros. Se contaron las células presentes en los cuatro cuadros ubicados en las esquinas de la cámara, el número obtenido se dividió entre cuatro y se multiplicó por 10000; si se hizo una dilución, se multiplicó también por esta (Figura 5); el valor resultante es el número de células por mililitro (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota 2006).

La concentración celular del cultivo en suspensión se midió mediante un método óptico de marco de lectura horizontal, para esto se utilizó un espectrofotómetro UV-visible (Biomate 3 Thermo Scientific), se procedió tomando 0.5 mL de muestra, se midió su densidad óptica a una longitud de onda de 677 nm (absorbancia específica para el cultivo de esta especie) utilizando como blanco medio F/2, la medición se realizó posteriormente a la agitación mecánica de la muestra; la diferencia de densidad óptica se relacionó con la cantidad de masa

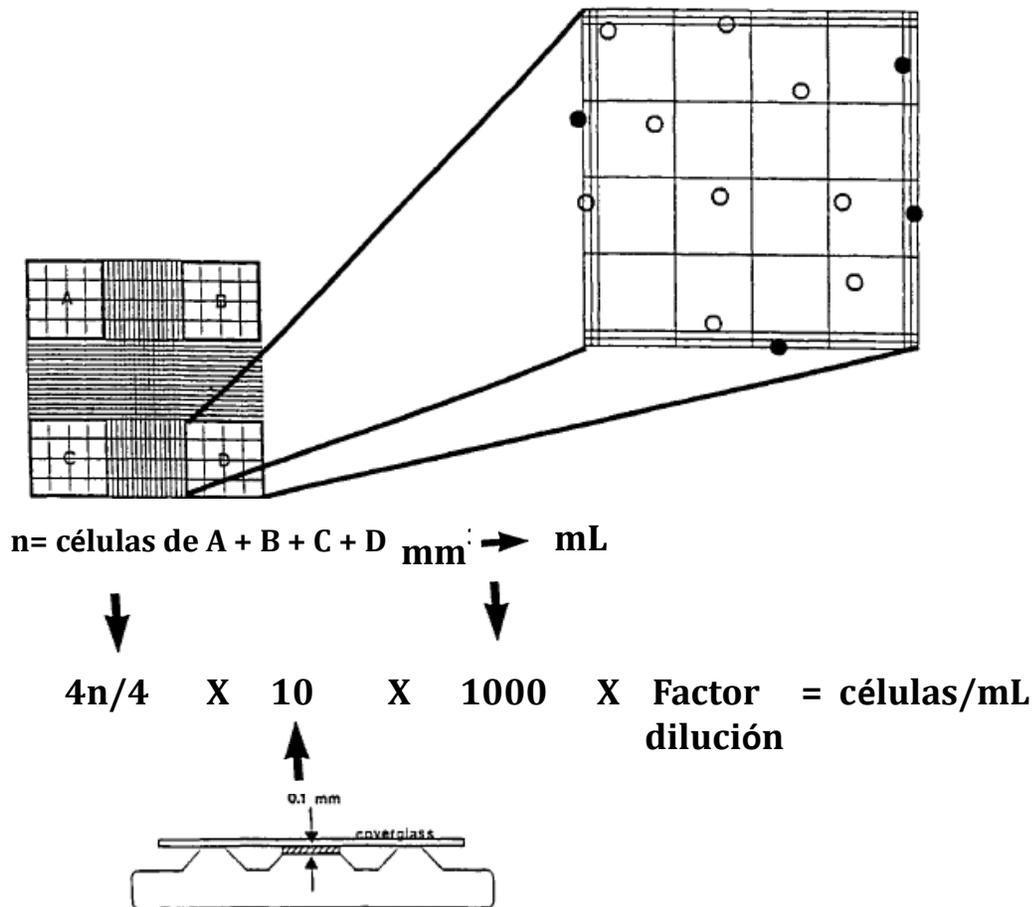


Figura 5. Calculo del número celular utilizando el hemocitómetro. Tanto para el conteo celular como para la determinación de viabilidad por colorante de exclusión, se cuentan todas las células dentro del área limitada por las líneas triples. Adaptada de Richardson y Fedorof (2001)

celular presente y se ajustó con las mediciones de concentración celular realizada por otros métodos (Mikschofsky y col 2009).

Las curvas de crecimiento se realizaron de acuerdo a López-Elías y col (2013). Se determinó la densidad celular, así como el número de células por mililitro (cel mL^{-1}). En base a estos valores, se calcularon los parámetros que describen la eficiencia del crecimiento celular, como son: la tasa de crecimiento específico y el tiempo de duplicación, utilizando las formulas propuestas por Godoy-Hernández y Vázquez-Flota (2006).

Tasa de crecimiento específico:

biomasa al tiempo t , y μ es la tasa de crecimiento específico.

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde X_0 es la biomasa inicial, X es la b

Tiempo de duplicación:

$$dt = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde μ es la tasa de crecimiento específico.

3 Obtención de la biomasa microalgal (BM)

La cosecha de la biomasa de la microalga *P. tricornutum* se realizó cuando el cultivo se encontró en el máximo de la fase exponencial, misma que fue detectada a través de la cinética de crecimiento. Para la recuperación de la BM se emplearon dos métodos en conjunto floculación y centrifugación.

a Floculación con quitosano

Con la finalidad de utilizar la biomasa en un enfoque alimentario, durante el

proceso de separación de esta del medio líquido, se utilizó quitosano al ser de carácter orgánico, mismo que resulto ser amigable, de fácil manejo y no toxico. (Ahmad y col 2011; Faraid y col 2013).

Se establecieron las mejores condiciones de floculación de la BM, para lo cual se evaluaron diferentes condiciones tales como: concentración de quitosano, tiempo de reposo y ajuste de pH del medio de cultivo (Figura 6). Donde se obtuvo la eficiencia de floculación, misma que determinó el mejor tratamiento a utilizar en la colecta de la BM (Romero y Ferrán 2001; Knuckey y col 2006; Sirín y col 2012).

Las diferentes concentraciones de quitosano evaluadas fueron: 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg L⁻¹ (Romero y Ferrán 2001; Farid y col 2013). En combinación con cuatro condiciones de pH, que fueron: pH nativo, pH de 8, 9 y 10, los cuales fueron ajustados con una base orgánica (Na₂CO₃), utilizando la metodología reportada por Sirin y col (2012). Mientras que los tiempos de reposo analizados fueron: 1, 4, 6, 8 y 24 h, mismos que se seleccionaron con base a lo reportado previamente (Salim y col 2011; Sirin y col 2012).

Estas determinaciones se realizaron por triplicado, tomando 100 mL del cultivo de la microalga para cada concentración de quitosano evaluada, mismos que fueron colocados en frascos de cristal lo que permitió observar los cambios entre los distintos tratamientos. Se tomaron 0.5 mL de muestra, se midió su densidad óptica a una longitud de onda de 677 nm (absorbancia específica para el cultivo de esta especie) utilizando como blanco el cultivo de la microalga al tiempo cero, la medición se realizó en un espectrofotómetro UV-visible; la diferencia de densidad

óptica se relacionó con la eficiencia del proceso de floculación, la cual se calculó

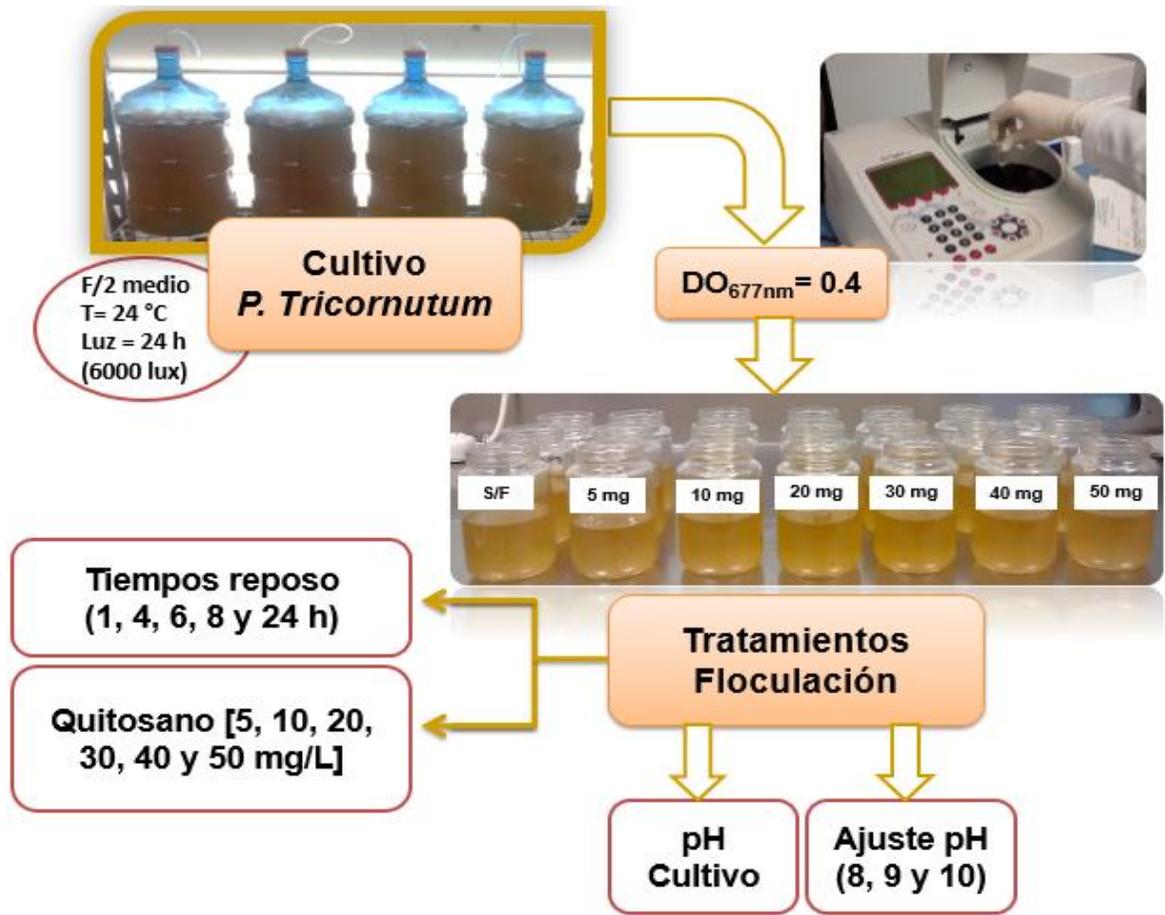


Figura 6. Diagrama de proceso de floculación

mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Eficiencia de Floculación} = \frac{DO_{677} (ti) - DO_{677} (tf)}{DO_{677} (ti)} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde la diferencia entre la densidad óptica inicial del cultivo (DO_{ti}), menos la densidad óptica final del cultivo (DO_{tf}), entre la densidad inicial del cultivo (DO_{ti}) por 100, es igual al porcentaje de eficiencia de floculación (Faraid y col 2013).

b Centrifugación

Una vez que se realizó la floculación con quitosano, la BM se recuperó al decantar el medio líquido, y posteriormente se centrifugó a 3000 g por 15 min, con la finalidad de eliminar completamente el medio de cultivo.

4 Obtención de la biomasa residual

Para obtener la biomasa residual de la microalga *P. tricornutum*, se realizó un proceso de extracción de aceite, en conjunto con un proceso de centrifugación y secado (Figura 7).

a Extracción de aceite

El proceso de extracción de aceite se llevó a cabo de acuerdo a la metodología de Bligh y Dyer (1959), utilizando ciertas modificaciones descritas por Soto-León y col (2014). La biomasa recolectada húmeda BM se pesó para definir la cantidad de la mezcla de solventes (cloroformo-metanol en una relación 2:1) v/v, requeridos para la extracción de aceite; se adicionaron 5 mL de la mezcla de solventes por cada g de muestra y se homogenizó, para aplicar un proceso de sonicación durante 3 h, utilizando un procesador ultrasónico

(MICROSON mod XL200), acoplado con un sonotrodo P-1, con la finalidad de tener una mayor ruptura celular y extracción de aceite. Posteriormente se ajustó la relación de solventes, utilizando metanol-



Figura 7. Diagrama de flujo para obtención de la BR de *P. tricornutum*

cloroformo-agua en una relación (2:1:0.8 v/v), se agito la mezcla durante 30 min. La separación de la BR de los solventes y aceite se realizó mediante centrifugación a 3000 x g por 15 min; se secó en una estufa con aireación a 40 °C por 24 h. Finalmente la BR en polvo fue obtenida con la ayuda de un molino, misma que fue almacenada en refrigeración a 4 °C, hasta su análisis.

5 Composición química de la BM y BR de *P. tricornutum*

El análisis químico proximal se realizó tanto a la biomasa microalgal como la residual, siguiendo las técnicas propuestas por la AOAC (1999):

a Humedad

Se utilizó el método 925.10 de AOAC (1999). Se determinó la pérdida de humedad de la muestra basándose en la pérdida de peso después de someterse a un calentamiento. Se pesó 3 g de muestra y se colocaron en una charola de aluminio en una estufa con circulación de aire forzado 80 °C por 24 h. La prueba se realizó por triplicado.

b Proteína cruda

Se utilizó el método 960.52 de AOAC (1999), el cálculo se basó en el nitrógeno total, utilizando un factor de conversión de 6.25 (método microKjeldhal). La muestra fue digerida con H₂SO₄ concentrado y para su destilación se aplicó NaOH 40% (p/v). El destilado fue recolectado en una disolución de ácido bórico al 4%; se valoró con una solución de HCl 0.1 N. La prueba se realizó por triplicado.

c Lípidos

Se determinó de acuerdo al método de la AOAC (1999). Se pesaron 2.5 g de muestra y se realizó la extracción usando el equipo Saxtec Sistem HT 1043 Extration Unit (Tecator, Suecia); como disolvente se utilizó hexano. La prueba se realizó por triplicado.

d Cenizas

Se utilizó el método 934.01 de AOAC (1999). Se pesaron 2 g de muestra se colocaron en un crisol (a peso constante) de porcelana, y se sometió a incineración en una mufla a 550 °C hasta que se obtuvo una ceniza gris a peso constante; se llevó a temperatura ambiente en un desecador y se pesó. La prueba se realizó por triplicado.

e Carbohidratos

El porcentaje de carbohidratos fue calculado por diferencia de 100, tomando en consideración los porcentajes de humedad, proteína, lípidos y cenizas.

f Fibra dietaría total

La fibra dietaría total se evaluó solamente en la BR, y corresponde a la suma de la fibra insoluble y soluble.

1) Insoluble

Se determinó de acuerdo al método oficial 985.29 (AOAC 1999), y siguiendo las instrucciones del kit de análisis de fibra dietaría total (TDF-100, Sigma). Un gramo de muestra seca se gelatinizo en presencia de α -amilasa termoestable, posteriormente se hizo una digestión enzimática con proteasa y amiloglucosidasa para degradar las proteínas y almidón presentes en la muestra. Para la precipitación de la fibra se adicionaron cuatro volúmenes de etanol. El residuo

total se filtró y lavó con etanol al 78%, etanol al 96% y acetona. Posteriormente el residuo se secó a 80°C por 12 h, se registró el peso, se determinó el contenido de proteína y cenizas del residuo. El contenido de fibra insoluble se calculó empleando

la siguiente fórmula:

$$FI = \frac{\text{Peso del residuo} - P - A}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

Dónde: Peso del residuo es el promedio de los pesos (mg) de los residuos de las muestras; P y A son los pesos (mg) de proteína y cenizas de los residuos; pero de la muestra es el promedio de los pesos (mg) de las muestras crudas.

2) Soluble

Se partió del residuo obtenido del filtrado de fibra insoluble; para la precipitación de la fibra soluble se adicionaron cuatro volúmenes de etanol y se dejó en reposo 12 h. Posteriormente se filtró y lavó con etanol al 78%, etanol al 96% y acetona. Finalmente, el residuo se secó a 80°C por 12 h, se registró el peso, se determinó el contenido de proteína y cenizas del residuo. El contenido de fibra insoluble se calculó empleando la ecuación 4.

6 Propiedades nutraceuticas de la BM y BR

a Obtención de extractos de fitoquímicos libres

Se realizó la extracción de fitoquímicos libres utilizando dos solventes distintos (etanol y metanol), siguiendo la metodología descrita por Adom y Liu (2002) Figura 8.

1) Etanólicos

Los fitoquímicos libres se extrajeron de 0.25 g de muestra con 5 mL de etanol al 80% (v/v), se agitaron en un rotator (OVAN noria R, EUA, 2010) a velocidad 25 por 10 min, se centrifugaron a 3000 x *g*/ 10°C durante 10 min. El sobrenadante se concentró en un tubo cónico a 45°C a presión baja (Apud Vac Concentrator, Thermo Elector Corporation hasta un volumen de 1 mL, se almacenó a 4°C hasta

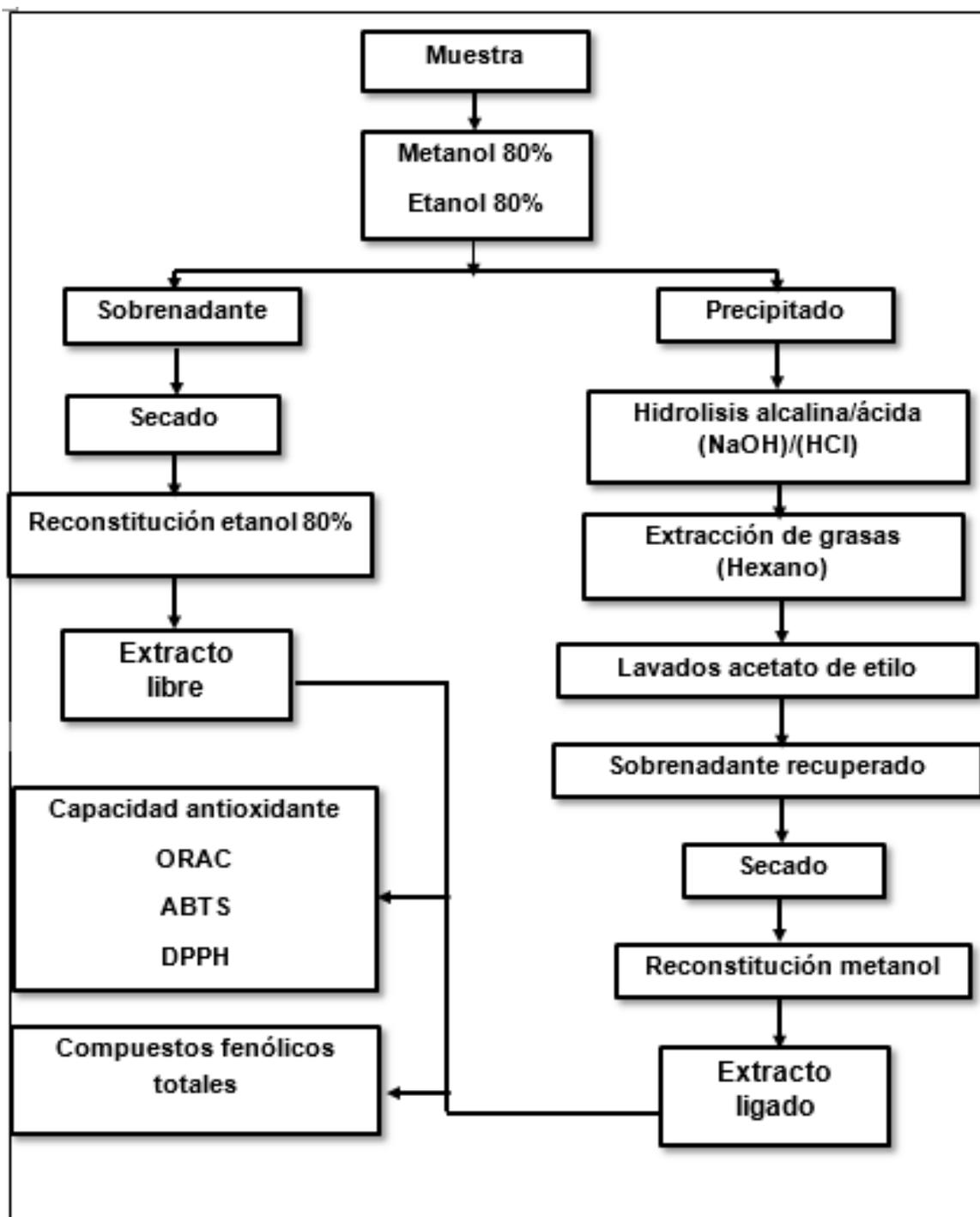


Figura 8. Diagrama de flujo para la obtención de fitoquímicos. Tomado de (Adom y Liu 2002; Mora-Rochín y col 2010)

su utilización en la determinación de capacidad antioxidante. El precipitado se guardó para la obtención de los extractos fitoquímicos ligados.

2) Metanólicos

Los fitoquímicos libres se extrajeron de 0.25 g de muestra con 5 mL de metanol al 80% (v/v), se agitaron en un rotator (OVAN noria R, EUA, 2010) a velocidad 25 por 10 min, se centrifugaron a $3000 \times g$ / 10°C durante 10 min. El sobrenadante se concentró en un tubo cónico a 45°C a presión baja (Apud Vac Concentrator, Thermo Elector Corporation hasta un volumen de 1 mL, se almacenó a 4°C hasta su utilización en la determinación de capacidad antioxidante. El precipitado se guardó para la obtención de los extractos fitoquímicos ligados.

b Obtención de los extractos de fitoquímicos ligados

En la extracción de los fitoquímicos ligados, se utilizaron dos solventes distintos (etanol y metanol); se empleó el método de Adom y Liu (2002), con ligeras modificaciones de Mora-Rochín y col (2010) (Figura 8).

1) Etanólicos

El precipitado obtenido de la extracción de fitoquímicos libres empleando etanol como solvente fue digerido con 5 mL de NaOH 2 M, se eliminó el oxígeno usando N_2 gas, se sometió a tratamiento térmico en baño maría a 95°C / 30 min, se agitó durante 1 h a temperatura ambiente (25°C). La mezcla se neutralizó con 1 mL de HCl concentrado, se agitó por 2 min en un vortex y posteriormente en un rotator (OVAN noria R, EUA, 2010) con velocidad 25 rpm por 10 min, se agregaron 5 mL de hexano; se repitió la misma operación de agitación mediante el vortex y rotator y se centrifugó a $3000 \times g$ / 10°C por 10 min, se extrajo el

acetato de etilo y se almacenó en un tubo cónico; esta extracción se realizó hasta la obtención de un volumen de 25 mL. El acetato de etilo se evaporó en su totalidad (Apud VAc Concentrator, Thermo Elector Corporation). El extracto seco fue reconstituido con metanol y se almacenó a 4°C hasta su posterior utilización en la determinación del contenido de fitoquímicos y la capacidad antioxidante correspondiente a fitoquímicos ligados.

2) Metanólicos

El precipitado obtenido de la extracción de fitoquímicos libres empleando metanol como solvente fue digerido con 5 mL de NaOH 2 M, se eliminó el oxígeno usando N₂ gas, se sometió a tratamiento térmico en baño maría a 95°C/30 min, se agitó durante 1 h a temperatura ambiente (25 °C). La mezcla se neutralizó con 1 mL de HCl concentrado, se agitó por 2 min en un vortex y posteriormente en un rotator (OVAN noria R, EUA, 2010) con velocidad 25 rpm por 10 min, se agregaron 5 mL de hexano; se repitió la misma operación de agitación mediante el vortex y rotator y se centrifugó a 3000 x g/ 10°C por 10 min, se extrajo el acetato de etilo y se almacenó en un tubo cónico; esta extracción se realizó hasta la obtención de un volumen de 25 mL. El acetato de etilo se evaporó en su totalidad (Apud VAc Concentrator, Thermo Elector Corporation). El extracto seco fue reconstituido con metanol y se almacenó a 4°C hasta su posterior utilización en la determinación del contenido de fitoquímicos y la capacidad antioxidante correspondiente a fitoquímicos ligados.

c Determinación de la capacidad antioxidante (CAox)

La CAox de los extractos etanólicos y metanólicos de fitoquímicos libres y ligados, tanto de la biomasa microalgal como residual, se determinó por los métodos de ORAC, ABTS y DPPH, como se describen a continuación.

1) Método ORAC

El método de capacidad de absorción de radicales oxígeno (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC), desarrollado para compuestos hidrofílicos etanólicos y metanólicos (Cao y col 1995; Ou y col 2001; Wu y col 2004), se basa en la degradación del compuesto 2,2'-Azobis (amidinopropano) (AAPH) que produce radicales peróxido (ROO^\cdot), los cuales oxidan al compuesto fluorescente, diclorofluoresceína (DCFH) al compuesto no fluorescente, diclorofluorescina (DCF). El grado de inhibición de los antioxidantes (fitoquímicos) de atrapar a los radicales libres se utilizó como base para calcular la capacidad antioxidante.

La solución de AAPH se preparó pesando 0.207 g del reactivo y se aforó en un matraz volumétrico de 5 mL con un buffer de fosfato (pH 7.4). La fluoresceína se preparó una concentración de 0.1 mM con buffer de fosfato (pH 7.4). Para la medición fueron diluidos los extractos de fitoquímicos libres y ligados usando buffer fosfato (pH 7.4), se adicionó 25 μL de AAPH por medio del auto dispensador del equipo previamente programado. Las muestras y el control se analizaron por cuadruplicado. La reacción se llevó a 37°C y la fluorescencia fue medida a 485 nm de excitación y 538 nm de emisión, por un lapso de 40 min, la reacción con los radicales peróxidos generó la pérdida de la fluorescencia con el tiempo.

El efecto antioxidante fue integrado con el área neta bajo la curva sobre la pérdida de la fluorescencia (AUC) [$AUC_{AOX} - AUC_{no\ AOX}$]. Los valores ORAC se reportaron como equivalente de Trolox. Se generó una curva estándar de cinco puntos (concentración de 25 a 100 μM), y los Trolox equivalentes de la muestra fueron calculados usando la siguiente ecuación lineal o cuadrática ($Y = a + bX$, lineal; o $Y = a + bX + cX^2$, cuadrática) entre la concentración de Trolox (Y) (μM) y el área neta bajo la curva de la disminución de la fluoresceína (X) ($ABC_{muestra} - ABC_{blanco}$). La regresión lineal se utilizó en un rango de 100-25 μM de Trolox. Los datos se expresaron como equivalente de Trolox en micromoles μmol (ET) g^{-1} muestra (bs) (Ou y col 2001; Prior y col 2005).

2) Método ABTS

Se estimó la actividad captadora de radicales libres mediante el ensayo de decoloración del catión radical ABTS propuesto por Re y col (1999), el cual se basa en la reducción del radical ABTS^{**} por los antioxidantes presentes en los extractos evaluados. El compuesto ABTS se disolvió en agua desionizada a 7 mM. Una solución stock del catión radical ABTS^{**} se diluyó en PBS hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734 nm. Se transfirieron 20 μL del blanco y los extractos en una celda de cuarzo, el ensayo inicio cuando se adiciono 1980 μL de la solución ABTS^{**}. Se registró la absorbancia a 734 nm 15 minutos después de haber iniciado el ensayo y se calculó la perdida de absorbancia del ABTS^{**} respecto a un blanco. Se utilizó una curva de calibración con Trolox y los datos se expresaron expresaron como equivalente de Trolox en micromoles μmol (ET) g^{-1} muestra (bs).

3) Método DPPH

La actividad antiradical DPPH de los extractos etanólicos y metanólicos de fitoquímicos libres y ligados de la biomasa, se determinó utilizando la metodología descrita por Brand-Williams y col (1995) y modificado por Fukumoto y Mazza (2000) para microplaca de 96 pozos. Se partió de una solución DPPH (609 μM) disuelta en metanol absoluto, de la cuál se preparó una solución DPPH (150 μM) disuelta en metanol al 80%, ajustando su absorbancia ≈ 1 (520 nm) y se mantuvo a -20°C en la oscuridad previo a su uso. En una microplaca de 96 pozos, se inyectaron 22 μL de cada extracto, se añadieron 200 μL de la solución DPPH (150 μM). Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia en un lector de microplacas (SynergyTM HY Multi-Detection, Bio Tek, Inc., Winooski, VT, EUA) a 520 nm. Se utilizó como estándar una curva de Trolox (0 a 200 μM); para las diluciones de las muestras al igual que en la preparación de la curva se utilizó como diluyente metanol al 80%. Los resultados se expresaron como equivalente de Trolox en micromoles μmol (ET) g^{-1} muestra (bs).

d Determinación del contenido de fitoquímicos

1) Compuestos fenólicos totales

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos se utilizó el método original de Singleton y col (1999) adaptado para su uso en microplaca. Se realizó para los extractos etanólicos y metanólicos de fitoquímicos libres y ligados, tanto de la biomasa microalgal como de biomasa residual. En una placa de 96 pozos, se adicionaron 20 μL de extracto los cuales se oxidaron con 180 μL del reactivo Folin-Ciocalteu. Posterior a 3 min de reposo, se adicionó 50 μL de carbonato de

sodio al 7% y se llevó a incubación. Después de 90 min de incubación, se midió la absorbancia a 750 nm utilizando un lector de microplacas (Synergy™ HT Multidetector, Biotek, Inc., Winooski, VT). Se prepara una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar y el contenido de fenólicos totales se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG) g⁻¹ muestra (bs).

b) Carotenoides totales

La extracción de carotenos, se llevó a cabo solo en biomasa microalgal por el método descrito por Abdel-Aal y col (2007) y AACC (2013). En un tubo de centrifuga se pesaron 450-500 mg de muestra, se adicionaron 5 mL de una solución de agua saturada en butanol (ASB). La mezcla fue homogenizada y agitada por 5 min en un vortex a velocidad media-alta en la oscuridad; después se dejó en reposo y oscuridad en la campana de extracción a temperatura ambiente durante 60 min. Posteriormente se homogenizó el contenido del tubo por segunda vez en un vortex durante 5 min y se dejó reposar durante una hora más. La mezcla fue centrifugada a 4000 g x 5 min, a temperatura de 20 °C; el sobrenadante fue recolectado y utilizado para la cuantificación de carotenoides totales. El ASB se usó para llevar el espectro a cero, y finalmente se registró la absorción de las muestras a una longitud de onda de 450 nm en un espectrómetro. Se utilizó un estándar de luteína para construir una curva de calibración. La determinación se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos fueron expresados como µg de Luteína g⁻¹ de muestra (bs).

7 Propiedades fisicoquímicas de la BR de *P. tricornutum*

Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de la BR de la microalga *P. tricornutum*.

a pH

El pH se determinó de acuerdo al método 02-52, AOAC (1999), preparando una suspensión con 5 g de BR y 50 mL de agua destilada a 25°C, recientemente hervida, se agitó por 10 min a velocidad moderada. Posteriormente, en agitación se introdujó un electrodo para medir el pH. La determinación se realizó por triplicado.

b Color

Se utilizó la metodología reportada por Reyes-Moreno y col (2003). El color de las muestras se determinó utilizando un colorímetro Minolta Choma-meter mod CR-210 (Minolta LTD, Japón). Las determinaciones color se basan en el efecto triestímulo, donde **L** mide la brillantez y varía de 100 para un blanco perfecto a cero para un negro. Las dimensiones de cromaticidad son dadas por los parámetros **a** y **b**. El valor positivo de **a** esta asociado al color rojo y el negativo con el verde. El valor positivo de **b** está asociado al color amarillo y el negativo con el azul para la evaluación del color se utilizó aproximadamente 50 g de muestra, la cual se colocó en una tapa de de caja petri de vidrio Kimax de 15 cm de diámetro y se midió los parámetros correspondientes **L**, **a** y **b**. Se utilizó un mosaico blanco como referencia (estándar) de valores **L**, **a** y **b** conocidos (**L**=97.63, **a**=0.78 y **b**=2.85).

c Actividad de agua (a_w)

Para su determinación se utilizó un equipo marca Aqualab mod CX2 (Decagon Devices Inc, Pullman, WA, EUA). Una muestra de aproximadamente 2 g se colocó en una celda portamuestras del equipo hasta que alcanzo el equilibrio

(40-60 min). El instrumento se calibró con una dilución saturada de cloruro de potasio ($a_w = 0.876$). Las mediciones se realizaron por triplicado a 25 ± 1 °C (Milán-Carrillo y col 2002).

d Índice de solubilidad en agua (ISA) / Índice de absorción de agua (IAA)

Se utilizó el método descrito por Kanu y col (2009) y Anderson y col (1969). El índice de absorción de agua fue calculado como gramos de gel formados por gramo de muestra seca después de la centrifugación ($3000 \times g / 30$ °C/ 10 min) de una suspensión de BR (2.5 g de BR / 30 mL de agua). El índice de solubilidad en agua se evaluó pesando los sólidos obtenidos después de evaporar en una estufa el sobrenadante de las muestras. Se expresó como el porcentaje de sólidos secos

en 2.5 g de muestra. Las pruebas se realizaron por triplicado.

e Índice de dispersabilidad

Se utilizó la técnica reportada por Mora-Escobedo y col (1994). Se pesó 1 g de BR y se suspendió en 10 mL de agua destilada en un tubo cónico graduado. Las muestras se homogenizaron en Ultra Turrax ($10\ 000$ rpm x 5 min). La separación se midió después de 30 min de reposo.

8 Optimización de la formulación para elaborar de una bebida funcional

Mediante la metodología de superficie de respuesta se buscó obtener la formulación óptima de una bebida funcional a base de BR de la microalga *P. tricornutum*, la cual presente capacidad antioxidante Caox y aceptabilidad sensorial A altas.

a Diseño experimental

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (Mongomery 1991) y un diseño experimental central compuesto rotatable, utilizando como variables independientes CBR: Concentración de biomasa residual y CS: Concentración de saborizante, los niveles de variación de las variables fueron: concentración de biomasa residual CBR de 0 – 9 g y concentración de saborizante CS de 0 – 3 g. El diseño experimental generó en total 11 tratamientos a evaluar, de los cuales, cuatro correspondieron a combinaciones factoriales, otros cuatro a combinaciones axiales de las variables de proceso y tres a puntos centrales correspondientes a las réplicas del proceso; CAox y A como variables de respuesta.

A partir del diseño experimental donde se obtuvieron 11 tratamientos (formulaciones) distintos de CBR y CS (sabor tamarindo), se elaboraron las mezclas correspondientes. Se determinó la CAox de estos por el método ABTS; posteriormente se elaboraron las bebidas de acuerdo a las formulaciones antes mencionadas mismas que fueron evaluadas sensorialmente.

b Evaluación de las variables de respuesta

1) Capacidad antioxidante

La CAox de las 11 formulaciones fue evaluada en extractos de fitoquímicos libres y ligados obtenidos a partir de cada una de estas, mismas que fueron arrojadas por el diseño experimental. Los fitoquímicos libres y ligados se extrajeron a partir de la metodología descrita en el apartado VII, B, 5, b, 3), b) utilizando etanol como solvente. Se determinó la CAox utilizando el método ABTS descrito en el apartado VII, B, 5, b, 3), b).

2) Evaluación sensorial de las bebidas funcionales

a) Elaboración de las bebidas

Las bebidas se prepararon utilizando como base las proporciones arrojadas por el diseño experimental para las formulaciones; se siguió el diagrama de proceso descrito en la Figura 9, se utilizaron 300 mL de agua purificada, (0–9) g de biomasa residual y (0–3) g de saborizante (sabor tamarindo). Los ingredientes añadidos se mezclaron y homogenizaron, se pasteurizaron y se envasaron en envases PET de 300 mL y almacenadas de 4-8 °C hasta su análisis.

b) Análisis sensorial

Las bebidas fueron evaluadas usando panelistas no entrenados de ambos sexos, los cuales plasmaron sus resultados en una planilla de evaluación para cada bebida, donde se evaluaron atributos como: color, sabor, consistencia y aceptabilidad global, se utilizó una escala LAM (labeled affective magnitude), la cual es una escala bidireccional de 100 mm con una descripción verbal con rangos



Figura 9. Diagrama de flujo del proceso para la elaboración de bebidas funcionales

que van desde -100 (máximo valor de disgusto imaginable) hasta +100 (máximo gusto imaginable) en donde cero (ni me gusta, ni me disgusta). Posteriormente estos valores fueron transformados a una escala de 0 a 100 [0=máximo valor de

disgusto imaginable; 100=máximo gusto imaginable, donde 50= Ni me gusta, Ni me disgusta] (Cardello y Shchutz 2004). Esta transformación se realizó para obtener modelos matemáticos de predicción para la respuesta de aceptabilidad de cada uno de los tratamientos. Esta prueba permitió a los panelistas manifestar su grado de aceptación por el producto.

c Análisis de varianza y regresión

El análisis de varianza y regresión se realizó a los valores experimentales obtenidos para la capacidad antioxidante (CAox) y aceptabilidad (A) sensorial de bebidas funcionales elaboradas con formulaciones a bases de una mezcla de biomasa residual y saborizante de acuerdo al diseño experimental central compuesto rotatable de la metodología de superficie de respuesta (MSR), con dos variables de proceso, seleccionada para este estudio. El modelo de la Figura 10 muestra la relación entre las variables de proceso o independientes [X_1 = concentración de biomasa residual (g), X_2 = concentración de saborizante (g)] y las variables de respuesta o dependientes [Capacidad antioxidante y aceptabilidad] mediante un polinomio de segundo orden. Se aplicó análisis de regresión a los valores de las variables de respuesta obtenidas experimentalmente, los términos no significativos ($p > 0.1$) se eliminaron y se recalculó un nuevo polinomio (modelo de predicción) para cada una de las variables de respuesta (Khuri y Comell 1987). A partir de cada modelo de predicción se construyeron gráficas de superficie de respuesta y de contornos, para estudiar el efecto de las variables de proceso sobre

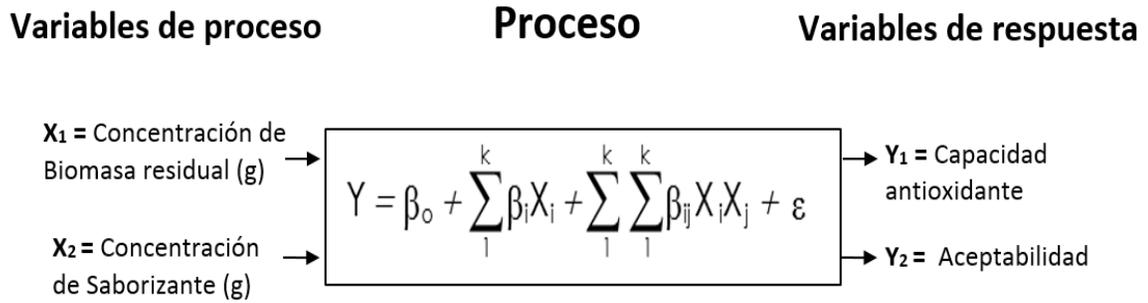


Figura 10. “Caja negra” del modelo matemático. Se muestra relación entre las variables de proceso y de respuesta de las formulaciones para la elaboración de bebidas funcionales a partir de biomasa residual

cada una de las variables de respuesta analizada. El análisis de los datos y la obtención de las gráficas de superficie de respuesta y de contornos se hizo con la ayuda del software Desig Expert versión 7.0.0 (Design Expert 2007).

d Optimización

El método numérico de deseabilidad descrito por De la Vara y Domínguez (2002) se aplicó para determinar la mejor combinación de las variables de proceso (CBR y CS) de la formulación a base de una mezcla de la biomasa residual y saborizante para la preparación de bebidas funcionales con capacidad antioxidante y aceptabilidad sensorial altas. Los dos modelos ajustados para las dos variables dependiente (CAox, A) se evaluaron en cualquier punto $X = (X_1, X_2)$ de la zona experimental, dos valores fueron estimados para cada modelo, $\hat{Y}_1(X)$ y $\hat{Y}_2(X)$. Cada $\hat{Y}_i(X)$ se transformó en un valor de (X) (deseabilidad individual), el cual está en el intervalo (0,1) y mide el grado de deseabilidad de la respuesta en referencia al valor óptimo deseado. En este caso se deseó que las variables de respuesta alcanzaran valores tan altos como fuera posibles. La deseabilidad global para las dos variables de respuesta se determinó a partir de las dos deseabilidades individuales (d_i) con la función matemática $D = (d_1 d_2)^{1/2}$, donde el valor óptimo ideal es $D=1$; un valor aceptable para D puede estar entre 0,6 y 0,8. El software estadístico Desing Expert versión 7.0 (Design Expert, 2007) se utilizó para la optimización del proceso de formulación a base de una mezcla de biomasa residual y saborizante para la preparación de bebidas funcionales.

Se buscó obtener una formulación óptima, se optimizó buscando maximizar la CAox y la A, utilizando una concentración de biomasa residual y saborizante dentro del rango del diseño experimental (Formulación optimizada= FO).

9 Análisis de la formulación óptima y evaluación sensorial de la bebida funcional obtenida

a Composición química

Se determinó la composición química (humedad, proteína, lípidos, fibra dietaria total, fibra soluble e insoluble, cenizas y carbohidratos) a la FO utilizando los procedimientos descritos en las secciones previamente.

b Contenido energético

El contenido energético de la bebida se calculó utilizando la composición química de la formulación óptima, considerando los siguientes factores de conversión: 1g de proteínas aporta 4 kcal, 1g de lípidos aporta 9 kcal y 1g de carbohidratos aporta 4 kcal (NOM.247-SSA1-2008).

c Determinación de la CAox por métodos ORAC, ABTS y DPPH

Se obtuvieron extractos de fitoquímicos libres y ligados de la FO, utilizando etanol como solvente, bajo la metodología descrita previamente. La CAox de los extractos se determinó por métodos ORAC VII, B, 5, b, 3), a); ABTS VII, B, 5, b, 3), b); y DPPH VII, B, 5, b, 3), c); descritos en los apartados mencionados. Los resultados fueron expresados en μmol equivalentes (ET)/100g muestra (bs).

d Contenido de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales de extractos etanólicos libres y ligados de la FO se determinó utilizando la metodología de Singleton y col (1999) descrita anteriormente. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido Gálico (EAG)/100g muestra (bs).

e Evaluación sensorial

La bebida funcional se elaboró utilizando como base la formulación óptima

obtenida del diseño experimental, se utilizó la metodología antes descrita. Además, se evaluó la bebida utilizando un enmascarador de olor con la finalidad de observar los cambios en los niveles de aceptación.

La bebida obtenida a partir de la FO (con y sin enmascarador de olor) fue evaluada usando panelistas no entrenados de ambos sexos, los cuales plasmaron sus resultados en una planilla de evaluación para cada bebida, donde se evaluaron atributos como: color, sabor, consistencia y aceptabilidad global, se utilizó el procedimiento descrito en el apartado VII, B, 7, d, 2).

10 Análisis estadístico

Los datos de las biomasas (completa y residual), así como la formulación optimizada a base de biomasa residual y saborizante para la elaboración de una bebida funcional se analizaron con un diseño experimental unifactorial y bifactorial, utilizando los paquetes estadísticos Minitab 16 y Desing Expert. Se aplicó la prueba Tukey para analizar diferencia significativa entre medias de los distintos tratamientos ($p \leq 0.05$).

VIII RESULTADOS Y DISCUSIONES

A CINÉTICA DE CRECIMIENTO

En la Figura 11 se muestran las curvas de crecimiento que presentó la microalga *Phaeodactylum tricornutum*. En las dos estrategias de medición del crecimiento celular (conteo celular y de densidad óptica) se observó el comportamiento sigmoideal típico de un microorganismo (Doble y Gummadi 2007); al inicio del cultivo se obtuvo un conteo de $1.03 \times 10^6 \pm 3.2 \times 10^4$ cel/mL y DO_{677nm} de 0.09 ± 0.03 ; se observó una fase de latencia corta de aproximadamente entre 1 d. Posteriormente, se observó una fase de crecimiento logarítmico con una duración cercana entre 5 y 7 d llegando al valor más alto al día 11 de cultivo con un conteo de $9.8 \times 10^6 \pm 6.8 \times 10^4$ cel/mL y DO_{677nm} 0.72 ± 0.01 ; se mantuvo en fase estacionaria alrededor de 9 d; el número de células/mL presentó un declive después del día 20 de cultivo, pasando entonces a la fase de muerte celular. A partir de las gráficas realizadas se obtuvieron los valores de la tasa de crecimiento específico (μ) = 0.25 d^{-1} y en base a esta, se obtuvo el tiempo de duplicación (dt) = 2.71 d (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota 2006).

El comportamiento que presentó *P. tricornutum* bajo las condiciones de cultivos antes descritas, fue similar a lo reportado en literatura por algunos investigadores. Santos-Ballardo y col (2015b) obtuvieron los valores más altos para la misma especie en el día 14, los cuales fueron: 1.13×10^7 cel/mL y una DO_{677nm} 1.11; Además obtuvieron una tasa de crecimiento específico (μ) = 0.29 d^{-1} y un tiempo de duplicación (dt) = 2.36 d. Así mismo, Acién-Fenández y col (2003) reportaron valores de (μ) = $0.096\text{-}0.192 \text{ d}^{-1}$ y un (dt) = $7.22\text{-}3.61$ d, para la misma

especie. Recientemente Goiris y col (2015) evaluó el crecimiento celular de *P. tricornutum*

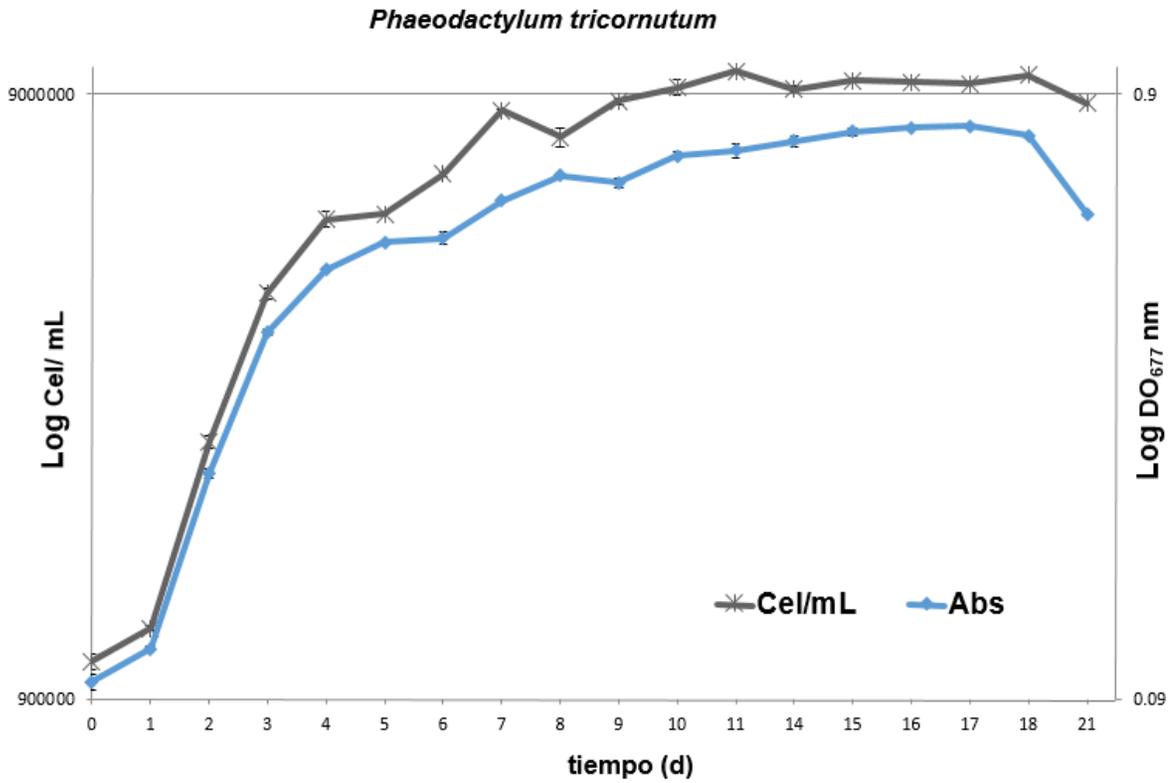


Figura 11. Curvas de crecimiento. Relación entre absorbancia espectrofotométrica y conteo celular en el cultivo de *P. tricornutum*

bajo condiciones de estrés, utilizando tanto la técnica espectrofotométrica como el conteo celular, obtenido un comportamiento similar entre estas técnicas, lo cual coincide con lo observado en el presente estudio.

Las pequeñas diferencias presentadas en nuestro estudio podrían atribuirse a que el crecimiento de las microalgas se ve severamente impactado por diversos factores, incluyendo las características del sistema de cultivo, así como las condiciones de cultivo (luz, pH, nutrientes, aireación) a las que sea sometida y la demanda fisiológica de cada microalga (Benavides y col 2013; Guedes y Malcata 2012). Por ende se pueden detectar diferencias para los valores máximos alcanzados, así como en los tiempos de cultivo en los que estos se obtuvieron; esto se debe a que las curvas de crecimiento obtenidas de células en suspensión dependen de varios factores, como pueden ser: el tipo de células presentes, la cantidad de medio y/o de inóculo, la agitación, y la edad de las células utilizadas, afectando la duración de las fases de crecimiento celular, así como la biomasa total obtenida, mas no el comportamiento típico, esto concuerda con los reportes de diversos autores acerca de las estrategias de crecimiento, quienes han observado comportamientos similares de crecimiento celular (Santos-Ballardo y col 2015b).

Al comparar las cinéticas de crecimiento, desarrolladas mediante distintas técnicas de medición, observamos comportamientos de crecimiento similares. Lo cual resulta ser de valiosa importancia encontrando un apoyo rápido, simple y específico en la metodología espectrofotométrica con la cual fue más fácil identificar el día de cosecha del cultivo de la microalga en estudio.

B OBTENCIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL

1 Tratamientos de floculación

En el cuadro 7 se muestran los tratamientos de floculación analizados, sobre las variables independientes: pH, tiempo de reposo (t) y concentraciones de quitosano (mg L^{-1}), utilizados para obtener las mejores condiciones de floculación de la BM, y los valores experimentales de la variable de respuesta: el porcentaje de eficiencia de floculación (%).

A partir de los datos experimentales del porcentaje de eficiencia de floculación (%) mostrados en el Cuadro 7, se realizó una comparación de medias por columnas y renglones utilizando el método de Tukey, ($p \leq 0.05$) para encontrar los mejores tratamientos de floculación. Donde hubo diferencia significativa entre los tratamientos antes mencionados. Con base a esta comparación los mejores tratamientos fueron a pH de 8, 9 y 10, a concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 mg L^{-1} de quitosano, en los cinco tiempos de reposo, donde se obtuvieron eficiencias de 95.42-100%; mismos que se representan con letras "aA", los cuales no presentaron diferencia significativa entre ellos. Así mismo se realizó una comparación múltiple de medias, para encontrar el mejor tratamiento, por el método de Tukey, ($p \leq 0.05$), en el cual se utilizó un HSD= 16.021, y se analizó con ayuda del software Minitab 16. Los valores no se muestran por su complejidad, al ser una comparación de 120 medias, lo que impide ser mostrados de una forma clara y concisa. En base a este análisis se obtuvieron que los mejores tratamientos son a pH de 9 en un tiempo de reposo de 6 h, a concentraciones de quitosano de 40 y 50 $\text{mg de quitosano L}^{-1}$, mismos que no

mostraron diferencia significativa entre el % de eficiencia en la floculación, obteniendo porcentajes superiores al 100%.

Cuadro 7. ¹Resultados de eficiencia de floculación² con quitosano. Se muestran valores experimentales; empleando, pH, concentración de quitosano (CQ)³ y tiempo de reposo (T)⁴ como variables de proceso

CQ ³ [mg/L]	pH																			
	7					8					9					10				
	T1 ⁴	T4	T6	T8	T24	T1	T4	T6	T8	T24	T1	T4	T6	T8	T24	T1	T4	T6	T8	T24
5	cdeA 82.05	bcdeA 86.62	bcdeAB 88.00	abcdeA 89.79	abcdA 92.21	eAB 74.38	bcdeA 86.33	abcdeA 89.15	abcdA 92.60	abcA 98.03	fc 49.41	abcdeB 89.66	abcdB 95.58	abA 100.00	aA 100.00	fc 58.13	deB 79.86	bcdeB 86.21	bcdeA 88.64	abcA 97.73
10	eA 80.87	cdeA 85.79	bcdeA 89.52	bcdeA 91.17	abcdA 97.38	deA 82.73	cdeA 89.08	abcdeA 94.71	abcdeA 96.76	abcA 100.00	fb 70.72	abcdAB 97.71	abAB 100.00	abA 100.00	aA 100.00	cdeAB 88.00	bcdeAB 91.14	abcdeAB 94.83	abcdeA 95.22	abA 100.00
20	fghiA 81.29	efghiA 82.90	defghiAB 84.76	cdefghiA 85.45	bcdefghiA 90.83	iAB 73.18	abcdeA 93.87	abcdeA 98.66	abcdA 99.72	abcA 100.00	ghIB 78.14	abA 100.00	abAB 100.00	abA 100.00	aA 100.00	hiB 77.46	abcdeA 95.22	abcdeAB 98.90	abcdeA 98.59	abA 100.00
30	fA 69.99	defA 76.48	defB 76.21	defA 79.31	cdeA 87.86	efAB 72.05	abcA 95.56	abcA 99.58	abcA 100.00	abcA 100.00	bcdA 92.03	abA 100.00	aAB 100.00	aA 100.00	abA 100.00	cdAB 88.16	abcA 97.41	abcA 99.84	abcA 99.37	abA 100.00
40	fb 24.67	efB 39.93	deC 45.45	cdB 56.07	cb 70.90	cb 67.23	abA 96.90	abA 100.00	abA 100.00	abA 100.00	abA 100.00	aA 100.00	aA 100.00	aA 100.00	aA 100.00	bAB 89.77	abA 99.37	abAB 98.67	abA 98.98	abA 100.00
50	dC 8.39	cdC 16.83	cd 24.62	cC 30.34	bc 56.21	bc 51.73	aA 95.42	aA 98.94	aA 100.00	aA 100.00	aA 100.00	aA 100.00	aA 100.00	aA 100.00	aA 100.00	aA 96.54	aA 99.29	aA 100.00	aA 100.00	aA 100.00

¹Las medias se separan por renglones y columnas, aplicando la prueba de Tukey, $\alpha=0.05$. ^a-Medias con la misma letra minúscula en un mismo renglón no son diferentes (HSD=16.021; $p\leq 0.05$). ^{A-D}Medias con la misma letra mayúscula en una misma columna no son diferentes (HSD=12.887; $p\leq 0.05$)

²Los valores en % representan el promedio de tres réplicas

³CQ= Concentración de quitosano (mg/L)

⁴T1-T24= Tiempo de reposo (h)

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ahmad y col (2011) quienes alcanzaron eficiencias por encima del 100% con el uso de quitosano. Del mismo modo los resultados coinciden con lo reportado por Sirin y col (2012) quienes analizaron diferentes concentraciones de quitosano, así como diferentes pH, obteniendo porcentajes por encima del 95% a pH alcalinos, en la colecta de *P. tricornutum*. Comportamiento similar se obtuvo en la cosecha de *Nannochloropsis* donde el % de eficiencia alcanzada fue hasta de un 95% utilizando pH de 7, 8 y 9, y concentraciones de 20-140 mg L⁻¹ de quitosano (Farid y col 2013). Tuan y col (2009) obtuvo porcentajes de eficiencia por encima del 80% utilizando una concentración de 20 mg L⁻¹ de quitosano a pH de 7, 8 y 9, en la recuperación de biomasa de una microalga café.

Durante los experimentos se obtuvieron % de eficiencia altos utilizando quitosano, esto podría deberse a la interacción de este con las microalgas, la cual está mediada por la interacción iónica entre los grupos amino cargados positivamente del quitosano (NH₂⁺) y los polisacáridos cargados negativamente en la superficie de la microalga. Además, cuando se ajustó el pH se obtuvieron valores aún más altos de eficiencia, esto posiblemente a que a pH alcalinos las cargas positivas del quitosano, unido a la microalga, desaparecen gradualmente (punto de neutralización a pH 7.9) lo que provoca que el quitosano precipite, favoreciendo la floculación (Gualteri y col 1988).

Sin embargo, se ha descrito que más que encontrar una concentración o dosis óptima de quitosano, posiblemente los efectos del proceso de floculación y sedimentación de la BM, dependen directamente de la concentración celular inicial, medio de cultivo utilizado, el tipo y tamaño de célula (especie) en cuestión

(Ahmad y col 2011; Sirin y col 2012; Liu y col 2014). A pesar de ello, el uso de quitosano como floculante resulto ser una técnica promisorio y efectiva en la cosecha de BM de *P. tricornutum*, permitiendo la utilización de esta en diversos sectores incluyendo el alimentario (Barros y col 2015).

C COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PROPIEDADES NUTRACÉUTICAS DE LA BM

1 Composición química

El Cuadro 8 muestra la composición química de la BM de *P. tricornutum*. El contenido de proteínas fue de 31.98%, de lípidos de 7.33%, de cenizas de 12.29% y de carbohidratos de 48.37%. Estos valores se encuentran dentro de lo reportado en literatura por algunos investigadores (Fábregas y col 1997; Cerón-García y col 2000; Sánchez-Mirón y col 2003). Kaixian y Borowitzka (2003) evaluaron el efecto de la deficiencia de nitrógeno y luz en el crecimiento del cultivo de la misma especie, obteniendo valores similares, en cuanto a proteínas 16-51%, lípidos 9-28% y carbohidratos 15-28%. Otro estudio realizado por Guil-Guerrero y col (2004) obtuvieron valores en la composición química, proteínas 36%, lípidos 18%, cenizas 15.9% y carbohidratos 26%, comparables con los del presente estudio en cuanto a proteínas y cenizas, tomando en cuenta que dichos investigadores utilizaron un medio de cultivo distinto, intensidad de luz e implementaron tasas de dilución. Investigaciones más recientes han evaluado la composición proximal de *P. tricornutum* bajo condiciones de estrés natural, es decir utilizando sistemas de cultivo Raceway, solamente con luz solar, obteniendo valores interesantes en cuanto proteínas un 26.53%, lípidos, 7.61%, cenizas 20.92% y carbohidratos 18.96% (Zhao y col 2014), los cuales son comparables con los obtenidos en el presente trabajo.

Cuadro 8. Composición química de la biomasa microalgal de *P. tricornutum*

Composición química (% bs)	Biomasa	
Proteínas	31.98 ± 0.46	Resultados representan el promedio de tres réplicas ± desviación estándar.
Lípidos	7.33 ± 0.23	
Cenizas	12.29 ± 0.26	
Carbohidratos	48.37 ± 0.34	

Así mismo nuestros resultados coinciden con la reciente investigación de Tibbetts y col (2015b), donde se analizó el cultivo de la misma especie en fotobiorreactor con aereación, luz continua e inyección de CO₂, donde se obtuvieron valores en cuanto a proteínas de 39.6%, lípidos 18.2%, cenizas 17% y carbohidratos 25.2%.

Es importante recordar que tanto los sistemas como las condiciones de cultivo, el suministro o limitación de nutrientes, y el proceso relacionado con técnicas de cosecha implementadas sobre el cultivo son parámetros que están directamente relacionados con la composición química que presentaran las microalgas, esto a pesar de que sea la misma especie, enfatizando que dicha composición será decisiva para determinar el uso y/o aplicación que se le dará a la BM obtenida (Rodolfi y col 2009; Koller y col 2012; Becker 2013; Guedes y col 2014a; Hudeck y col 2014; Tibbetts y col 2015b).

2 Propiedades nutraceuticas

a Capacidad antioxidante y compuestos fenolicos totales

La determinación de la CAox por métodos ORAC, ABTS y DPPH, así como el contenido de compuestos fenolicos de la BM de *P. tricornutum*, fueron evaluados en extractos hidrofílicos etanolicos y metanolicos, para fitoquímicos libres y ligados, los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 9. En general, los resultados muestran que los fitoquímicos ligados aportaron la mayor CAox en todos los métodos analizados, tendencia similar mostraron en cuanto al contenido de compuestos fenolicos, esto podría deberse al método de extracción y tipo de solvente utilizado, el cuál pudiera haber liberado y dejado expuestos un mayor número de compuestos, siendo estos los responsables del aumento de la capacidad antioxidante (Floegel y col 2011).

Cuadro 9. Capacidad antioxidante y contenido de compuestos fitoquímicos presentes en la biomasa microalgal de *P. tricornutum*

Propiedad Nutracéutica	Extracto Etanólico	Extracto Metanólico
Capacidad Antioxidante		
ORAC¹		
Fitoquímicos libres	102.17 ± 1.47 ^a	102.43 ± 1.53 ^a
Fitoquímicos ligados	109.14 ± 1.59 ^a	109.73 ± 1.65 ^a
Total	211.32 ± 1.83 ^a	212.17 ± 2.35 ^a
ABTS¹		
Fitoquímicos libres	60.11 ± 0.54 ^a	56.94 ± 0.54 ^b
Fitoquímicos ligados	78.81 ± 1.09 ^a	78.50 ± 0.95 ^a
Total	138.93 ± 1.64 ^a	135.44 ± 1.45 ^b
DPPH¹		
Fitoquímicos libres	4.07 ± 0.07 ^a	3.60 ± 0.07 ^a
Fitoquímicos ligados	16.07 ± 0.24 ^a	15.94 ± 0.22 ^a
Total	20.15 ± 0.18 ^a	19.54 ± 0.27 ^a
Contenido Fenólicos Totales²		
Libres	4.60 ± 0.07 ^a	4.32 ± 0.05 ^b
Ligados	5.23 ± 0.08 ^a	5.22 ± 0.07 ^a
Total	9.83 ± 1.32 ^a	9.55 ± 1.06 ^b

Los valores representan el promedio de tres réplicas ± desviación estándar.

^{a-b} Medias con letras diferentes en el mismo renglón presentan diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$). ¹ μ moles equivalentes de Trolox (TE) g^{-1} muestra, (bs). ² mg equivalentes de ácido Gálico (EAG) g^{-1} muestra, (bs).

En cuanto al método de ORAC, se obtuvieron valores de CAox total (misma que se obtuvo de la suma de la capacidad antioxidante arrojada por los fitoquímicos libres y ligados) fue de 211.32 y 212.17 μmol equivalentes de Trolox (ET) g^{-1} muestra (bs), para extractos etanólicos y metanólicos respectivamente, no existió diferencia significativa entre los fitoquímicos extraídos con los diferentes solventes, mismos que fueron analizados por prueba Tukey, ($p \leq 0.05$). Valores del presente trabajo son superiores a lo reportado por Goiris y col (2012) quien encontró valor CAox de 46.29 μmol (ET) g^{-1} muestra (bs), en extractos etanólicos de la misma especie, sin embargo, como ya se menciona la CAox total es la suma entre las obtenidas para los fitoquímicos libres y ligados, y las diferencias entre los resultados de otros autores podrían atribuirse al método de extracción utilizado. Los valores obtenidos son comparables con los reportados por Ahmed y col (2014) quien analizó la CAox en extractos acuosos de *P. tricornutum*, reportando un resultado de 262.5 μmol (ET) g^{-1} muestra (bs). Si se toma en cuenta alimentos reconocidos por su alta CAox como lo son arándanos y moras con valores de 95.84 y 65.52 μmol (ET) g^{-1} muestra (bs) (AgricResServ 2007), podría considerarse la BM de *P. tricornutum* como fuente importante de compuestos antioxidantes con gran potencial de aplicación.

Los valores obtenidos por el método ABTS, fueron para fitoquímicos libres de 60.11 y 56.94 μmol (ET) g^{-1} muestra (bs), en extractos etanólicos y metanólicos respectivamente, mismos que presentaron diferencia significativa al ser analizados por la prueba Tukey, ($p \geq 0.05$); mientras que para fitoquímicos ligados se obtuvieron valores de 78.81 y 78.50 μmol (ET) g^{-1} muestra (bs), en extractos etanólicos y metanólicos respectivamente, los cuales no presentaron diferencia

significativa al ser analizados por la misma prueba. La CAox total fue obtenida de la suma de la obtenida para fitoquímicos libres y ligados fue de: 138.93 y 135.44 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs), para extractos etanólicos y metanólicos respectivamente, donde se encontró diferencia significativa. Dichos valores son superiores a lo reportado por Goiris y col (2012) quien obtuvo 49 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs), de capacidad antioxidante en extractos etanólicos de la misma especie. Estos resultados coinciden con un estudio realizado por Plaza y col (2010) quien reportó rangos de CAox entre 146-852 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs) analizada en extractos acuosos de ciertas microalgas y cianobacterias, mismos que fueron obtenidos por extracción supercrítica. Por otro lado, los resultados obtenidos podrían ser comparables con la CAox de frutos conocidos como la guayaba agría y grosella las cuales se reportan valores de 66.79-85.2 y de 75-200 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs) (Zapata y col 2013; Narváez-Cuenca y col 2014).

Para el método DPPH, se obtuvieron valores de CAox con diferencia significativa por comparación de medias por prueba Tukey, ($p \geq 0.05$), para fitoquímicos libres, así como en el Total de CAox en extractos etanólicos y metanólicos; para fitoquímicos libres fue 4.07 y 3.60 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs), mientras que la CAox total fue de 20.15 y 19.54 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs), valores obtenidos para extractos etanólicos y metanólicos, en ambos casos respectivamente. Estos resultados son similares a lo reportado por Marxen y col (2007), quien analizo extractos metanólicos de la misma especie, obteniendo un valor de cAox de 20.58 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs). De la misma forma resulta interesante comparar estos valores con los reportados en literatura para crucíferos y frutas como brocoli y fresa 3.59 y 15.74 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs),

respectivamente (Takebayashi y col 2013). Xi y col (2014) evaluó extractos metanólicos de 14 genotipos de naranjita, encontrado rangos de valores de CAox entre 9.10-18.17 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs).

Por otro lado, el contenido de compuestos fenólicos obtenido en fitoquímicos libres fue de 4.60 y 4.32 mg equivalentes de ácido Gálico (EAG) g^{-1} muestra (bs); en fitoquímicos ligados de 5.23 y 5.22 mg (EAG) g^{-1} muestra (bs); el contenido de Fenólicos totales fue 9.83 y 9.55 mg (EAG) g^{-1} muestra (bs); en extractos etanólicos y metanólicos respectivamente en todos los casos; donde se presentaron diferencias significativas entre las medias analizadas por el método de Tukey, ($p \geq 0.05$), tanto de fitoquímicos libres como en el contenido de fenólicos totales en los distintos extractos. Los valores obtenidos para fitoquímicos libres antes mencionados son similares a lo reportado por Goiris y col (2015) quien analizó extractos etanol/agua 3:1 (v/v) de la misma especie, donde obtuvieron un contenido de compuestos fenólicos totales de 4.0 mg (EAG) g^{-1} muestra (bs). Así mismo los valores obtenidos en el total de compuestos fenólicos coincide con los reportado por Tibbetts y col (2015b), quienes reportaron un valor de 9.9 mg (EAG) g^{-1} muestra (bs), mismos que fueron determinados en extractos acuosos de *P. tricornutum*. De igual forma resulta curioso que el contenido de compuestos fenólicos para ciertos frutos podría ser menor que el entrado en la biomasa microalgal, pues en un estudio de Narváez-Cuenca y col (2014) sobre extractos metanólicos de grosella obtuvieron de un 4.0-6.0 mg (EAG) g^{-1} muestra (bs). A pesar de que el contenido de compuestos fenólicos en microalgas es bajo en comparación con el rango reportado para algunas plantas terrestres, las microalgas podrían representar una fuente

atractiva de este tipo de moléculas debido a sus facilidades de cultivo y procesamiento, así como por la presencia de ciertos compuestos bioactivos que solo pudieran ser encontrados en estas (Ahmed y col 2014; Ismaiel y col 2014).

Las diferencias encontradas en los valores tanto de CAox como contenido de fenólicos totales entre los extractos obtenidos podrían estar relacionados directamente a la naturaleza química de los solventes que se utilizaron para realizar la extracción de estos; misma relación ha sido analizada y evaluada por diversos investigadores (Li y col 2007; Hajimahmoodi y col 2010; Choochote y col 2014), atribuyendo principalmente estos comportamientos, al tipo de célula (especie), método de extracción y tipo de solvente utilizado para realizar esta, sin dejar de lado el impacto que tiene el sistema y condiciones de cultivo (nutrientes) (Babu y Wu 2008; Klejdus y col 2010; López y col 2011; Connan y Stengel 2011; Goiris y col 2015). Especialmente en esta microalga se ha concluido que aparentemente el mejor solvente que podría ser utilizado en el método de disrupción es una mezcla de etanol/agua 1:1 (v/v) (Rodriguez-García y Guil-Guerrero 2008; Goiris y col 2012; Balboa y col 2013; Guedes y col 2013) con ello se fundamentan los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Sin duda alguna uno de los valiosos potenciales de la BM de *P. tricornutum* que ha sido analizado y valorado es la presencia de compuestos bioactivos que pudieran estar relacionados con su CAox, la cual queda confirmada en el presente trabajo.

b Carotenoides totales

El contenido de carotenoides totales fue de 45 876.03 μg de Luteína g^{-1} muestra (bs), mismo que fue analizado en un extracto lipofílico de esta biomasa

microalgal. El valor obtenido en el presente estudio concuerda con lo reportado por Rychebosch y col (2014) quien evaluó el contenido de carotenoides totales presentes en la misma especie a partir de un extracto lipofílico, obteniendo un valor de $45\ 100\ \mu\text{g g}^{-1}$ muestra (bs). Siendo superior a lo reportado por Xia y col (2013) quien obtuvo un contenido de carotenoides de $8550\text{-}16\ 510\ \mu\text{g g}^{-1}$ muestra (bs), sin embargo, este análisis se realizó en base a fucoxantina un pigmento específico presente en *P. tricornutum*. Así mismo el valor obtenido en el presente trabajo es superior a lo obtenido por Ahmed y col (2014), quien analizó el contenido de carotenoides totales por HPLC en extractos metanol/diclorometano 50/50 (v/v) de biomasa microalgal de la misma especie aquí evaluada, obteniendo un valor de $3000\ \mu\text{g g}^{-1}$ muestra (bs).

Tomando en cuenta que los carotenoides son metabolitos secundarios o compuestos de estrés que están involucrados en mecanismos de protección química, su concentración podría depender de las condiciones de cultivo a las que sean sometidas las microalgas, involucrando en este caso la intensidad de irradiación de luz utilizada para el crecimiento de estas (Babu y Wu 2008; Ibañez y Cifuentes 2013; Goiris y col 2015). Aunado a esto, la posible discrepancia en los valores también podría atribuirse al método y tipo de solvente (con polaridad variadas) utilizado en la extracción, pH, tiempo de extracción, temperatura, así como la composición química de la especie analizada (López y col 2011; Goiris y col 2012; Choochote y col 2013; Ahmed y col 2014).

D COMPOSICIÓN QUÍMICA, PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y NUTRACÉUTICAS DE LA BR

1 Composición química y propiedades fisicoquímicas

El Cuadro 10 muestra la composición química y las propiedades fisicoquímicas de la BR de *Phaeodactylum tricornutum*. El contenido de proteínas fue de 36.67%, lípidos 1.07%, cenizas 15.46%, carbohidratos 46.78% de los cuales el contenido de fibra dietaría total fue 45.57%; en cuanto a fibra soluble se obtuvo un 2.02% y de fibra insoluble un 43.54%. Valores que podrían ser comparables con lo reportado por Zhao y col (2014) quien obtuvo valores de proteína de 32.5%, lípidos 6.12%, cenizas 17% y carbohidratos 16.14%, quien utilizó biomasa residual de la misma especie para evaluar su eficiencia en una co-digestión anaeróbica. Además, los valores obtenidos entre BM y BR mantuvieron comportamientos similares en ambos trabajos, al aumentar los mismos porcentajes en cuanto a proteínas y carbohidratos, después del proceso de extracción de aceite. Del mismo modo se observó y se ha reportado que el método de extracción de aceite implementado es determinante en la composición de éstos en la BR, así como en el contenido de otros componentes (Ehiaze y col 2009). Tibbets y col (2015b) obtuvieron un valor de proteínas en la BR de *P. tricornutum* de un 42.9% superior a lo obtenido en el presente estudio, sin embargo, las condiciones de cultivo utilizadas, así como el método de extracción de aceite para obtener la BR fueron distintos en ambos estudios. Desafortunadamente son escasas las investigaciones acerca de la composición química de la BR, sin embargo y a pesar de ello, los valores obtenidos en el

presente trabajo se encuentran dentro de los rangos reportados por otros investigadores que han analizado la BR de ciertas especies de

Cuadro 10. Composición química y propiedades fisicoquímicas de la biomasa residual de la microalga *P. tricornutum*

Propiedad	Biomasa residual
Composición química (% , bs)	
Proteínas	36.67 ± 0.43
Lípidos	1.07 ± 0.01
Cenizas	15.46 ± 0.03
Carbohidratos	46.78 ± 0.47
Fibra Dietaría Total	45.57 ± 0.17
Soluble	2.02 ± 0.02
Insoluble	43.54 ± 0.28
Fisicoquímicas	
Color	
Valor Hunter “L”	44.34 ± 0.31
“a”	-3.24 ± 0.01
“b”	13.38 ± 0.15
Actividad acuosa (a_w)	0.45 ± 0.01
Ph	7.12 ± 0.01
Índice de Absorción de Agua (g de gel/g de muestra seca)	3.40 ± 0.06
Índice de Solubilidad en Agua (g sólidos/100g de muestra seca)	2.25 ± 0.07
Dispersabilidad (%)	90%

Resultados representan el promedio de tres réplicas ± desviación estándar.

microalgas (Ehizae y col 2009; Li y col 2013; Ramos-Suárez y col 2014; Tibbetts y col 2015a). Toro y col (2013) reportó composición de biomasa residual de *B. Braunii*, en cuanto a proteínas de 48%, lípidos 4%, cenizas 21.1%, carbohidratos 22.6% y fibra 4.4%, la BR fue obtenida por el método de Soxhlet utilizando como disolvente éter de petróleo. Los valores obtenidos en el presente trabajo se encuentran dentro de los rangos reportados por Tibbetts y col (2014), para BR de distintas especies de microalgas, utilizando un sistema Soxtec automatizado como método de extracción de lípidos, una mezcla de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) se usó como disolvente; los resultados fueron para proteínas de 24.3-18.8%, lípidos 6.1-31.8%, cenizas, 2.6-2.8%, carbohidratos 33.6-43.9%, obteniendo de estos el contenido de fibra el cual fue de 11.4-41.3%. Se ha reportado que la composición química de la BR, será influenciada directamente por el método de extracción de aceite utilizado, así como los sistemas y condiciones de cultivos previos implementados, a pesar de que sea la misma especie (Chacón-Lee 2010, Becker 2013, Borowitzka 2013; Tibbetts y col 2015b)

Al observar los valores obtenidos en la composición química de la biomasa residual, se corrobora que la BR conserva componentes de interés y es notable su valioso potencial como alimento y/o ingrediente funcional y podría ser utilizado en la elaboración de bebidas funcionales (Cofrades 2013); por ende dichos valores podrían ser comparables con lo reportado en literatura de algunos granos de cereales y leguminosas, así como frutos que han sido utilizados como ingrediente funcional (Ramírez y Pacheco 2009; Egardt y col 2012; Milán-Carrillo y col 2012; Perales-Sánchez y col 2014). Tal es el caso del uso de harina de

avena, de la cual se obtuvo una composición química de; proteínas 11.3%, lípidos 5.5%, cenizas 2.9%, carbohidratos 70.4% (Luana y col 2014). Los valores obtenidos en el presente trabajo podrían ser comparables con harinas elaboradas a partir de mezclas de cereal-leguminosa, Rochín-Medina (2014), obtuvo una composición de proteínas 19.80%, lípidos 2.75%, fibra dietaria total 24.65%, de la cual un 7.67% fue de fibra soluble y un 16.98% de fibra insoluble, en una harina optimizada a partir de frijol negro y maíz azul. De igual forma nuestros resultados son comparables con lo reportado por Faccin y col (2009), quien utilizó harina de arroz como ingrediente funcional, la harina presentó una composición química en cuanto a proteínas de 12.69%, lípidos 29.20%, cenizas 8.88 % y carbohidratos 49.29%. Ghribi y col (2015) reportó una composición química para harina de garbanzo de 24.51% proteínas, 8.20% lípidos, 3.14% cenizas y 57.11% de carbohidratos, valores comparables con los obtenidos para la BR en el presente estudio.

En el Cuadro 10 se muestran las propiedades fisicoquímicas de la BR de *P. tricornutum*. La biomasa residual tuvo un valor Hunter "L" de 44.34 ± 0.31 , "a"= -3.24 ± 0.01 y "b"= 13.38 ± 0.15 , mientras que la diferencia total de color (ΔE) fue 53.78. ΔE representa la diferencia total de color en referencia a un estándar de color blanco. Valores mayores de ΔE significan harinas más oscuras. Por lo tanto, la biomasa residual es de una tonalidad clara. La BR presentó un valor de actividad acuosa de 0.45, correspondiente a valores donde el desarrollo de actividad enzimática, crecimiento de microorganismos y reacciones químicas se llevan a cabo, lo cual significa una larga vida de anaquel (Fennema 2001). Por otro lado, la BR presentó un pH de 7.12.

La BR de *P. tricornutum* presentó un índice de absorción de agua de 3.40 g gel/ g muestra (bs). Valor que concuerda con lo reportado por Guil-Guerrero y col (2004) quien analizó las propiedades funcionales de biomasa de *P. tricornutum* obteniendo un valor de índice de absorción de agua de 3.8 g de gel/ g muestra (bs). La absorción de agua de la biomasa de microalgas podría ser atribuida a un nivel alto de polisacárido capsular presente que protege a las células frente al proceso de desecación, mismo que permite crecer a la microalga en un ambiente marino (Ramus 1981; Kloareng y Quatrano 1988). El rango de aplicaciones de las harinas como ingrediente alimenticio, depende de las interacciones que sea capaz de mantener con el agua, siendo una propiedad decisiva en algunos alimentos que conllevan procesos de rehidratación; propiedades que dependen en gran medida de la naturaleza fisicoquímica de los constituyentes (Ramírez y Pacheco 2009). Por otro lado, la BR de *P. tricornutum* presentó un valor de índice de solubilidad en agua de 2.25 g sólidos/ 100g muestra (bs). En esta investigación la propiedad funcional de mayor interés es la dispersabilidad, ya que es importante para la preparación de bebidas; la BR presentó una dispersabilidad del 90%, siendo adecuada para elaborar bebidas. Además, la dispersabilidad se correlaciona, de manera directa con el grado de desnaturalización de las proteínas en un producto procesado; un valor alto de dispersabilidad indica una menor desnaturalización de proteínas (Visser y Thomas 1987).

Los valores obtenidos podrían ser comparados con harinas utilizadas como ingrediente funcional (Ramírez y Pacheco 2009; Mercado-Pedraza y col 2013). Montoya-Rodríguez (2011) analizó harina de amaranto obtenida a partir de un

proceso de extrusión obtenido valores de IAA 1.89-1.91 g de gel/ g muestra seca y dispersabilidad de 29.66-28.8%, mismos que son menores a los encontrados en el presente trabajo. Los valores obtenidos podrían ser comparables con los rangos reportados por Contreras-Jiménez y col (2014) para harina de maíz nixtamalizado IAA 2.36-2.95 g de gel/g muestra seca e ISA 7.19-13.31 g sólidos/100g muestra seca). Reyes-Moreno y col (2014) reportaron un valor de dispersabilidad de 60% menor a lo obtenido en el presente estudio, para una harina de maíz QPM y frijol, utilizada como ingrediente en la elaboración de una bebida funcional.

2 Capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales

El Cuadro 11 muestra la CAox por métodos ORAC, ABTS y DPPH, así como el contenido de compuestos fenólicos totales de la BR de *P. tricornutum*. La BR tuvo una mayor CAox en fitoquímicos ligados tanto en extractos etanólicos como metanólicos en todos los métodos analizados. Valores que demuestran el valioso potencial como fuente de antioxidantes que podría ser explotado de la BR (Tibbetts y col 2014; Batista y col 2013).

Por el método ORAC se obtuvieron valores de CAox total (misma que se obtuvo de la suma de la CAox arrojada por los fitoquímicos libres y ligados) de 106.22 y 105.55 μmol equivalentes de Trolox (ET) g^{-1} muestra (bs), para extractos etanólicos y metanólicos respectivamente, no existió diferencia significativa entre los fitoquímicos extraídos con los diferentes solventes, evaluados por prueba Tukey, ($p \leq 0.05$). Valores que podrían ser comparables con harinas utilizadas en la elaboración de bebidas nutraceuticas con potencial antioxidante. Rochín-Medina y col (2015) utilizó una mezcla de maíz-garbanzo

obteniendo una harina con una CAox de 99.72 μmol equivalentes de Trolox (ET) g^{-1} muestra (bs). Los valores obtenidos son superiores a lo reportado por Milán-Carrillo y col (2012) para una harina de amaranto obtenida por extrusión, la cual presentó una CAox de 39.03 μmol equivalentes de Trolox (ET) g^{-1} muestra (bs). Por otro lado, los resultados

Cuadro 11. Capacidad antioxidante y contenido de compuestos fitoquímicos presentes en la biomasa residual de la microalga *P. tricornutum*

Propiedad Nutracéutica	Extracto Etanólico	Extracto Metanólico
Capacidad antioxidante		
ORAC¹		
Fitoquímicos libres	36.20 \pm 0.30 ^a	36.13 \pm 0.40 ^a
Fitoquímicos ligados	70.02 \pm 0.62 ^a	69.42 \pm 0.68 ^a
Total	106.22 \pm 0.59 ^a	105.55 \pm 0.53 ^a
ABTS¹		
Fitoquímicos libres	23.02 \pm 0.75 ^a	20.26 \pm 0.62 ^b
Fitoquímicos ligados	44.90 \pm 0.90 ^a	44.18 \pm 0.90 ^a
Total	67.93 \pm 0.36 ^a	64.44 \pm 0.41 ^b
DPPH¹		
Fitoquímicos libres	2.42 \pm 0.05 ^a	2.17 \pm 0.06 ^b
Fitoquímicos ligados	7.11 \pm 0.17 ^a	7.05 \pm 0.14 ^a
Total	9.54 \pm 0.13 ^a	9.23 \pm 0.12 ^b
Contenido Fenólicos Totales²		
Libres	1.10 \pm 0.04 ^a	1.02 \pm 0.03 ^b
Ligados	1.79 \pm 0.06 ^a	1.79 \pm 0.03 ^a
Total	2.90 \pm 0.02 ^a	2.81 \pm 0.04 ^b

Los valores representan el promedio de tres réplicas \pm desviación estándar. ^{a-b} Medias con letras diferentes en el mismo renglón presentan diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$). ¹ μ moles equivalentes de Trolox (TE) g^{-1} muestra (bs). ² mg equivalentes de ácido Gálico (EAG) g^{-1} muestra (bs).

podrían ser comparable con frutos de consumo cotidiano. Park y col (2014) analizó la CAox de siete cultivares de Kiwi en extractos etanólicos y acuosos obteniendo valores de 17.4-37.1 y 20.4-42.1 μ mol equivalentes de Trolox (ET) g^{-1} muestra (bs), para extractos etanólicos y acuosos respectivamente.

En cuanto al método ABTS la CAox para fitoquímicos libres fue 23.02 y 20.26 μ mol (ET) g^{-1} muestra (bs), en extractos etanólicos y metanólicos respectivamente, mismos que presentaron diferencia significativa por prueba Tukey, ($p \geq 0.05$); mientras que para fitoquímicos ligados se obtuvieron valores de 44.90 y 44.18 μ mol (ET) g^{-1} muestra (bs), en extractos etanólicos y metanólicos respectivamente, los cuales no presentaron diferencia significativa al ser analizados por la misma prueba. La CAox total fue obtenida de la suma de la obtenida para fitoquímicos libres y ligados fue: 67.93 y 64.44 μ mol (ET) g^{-1} muestra (bs), para extractos etanólicos y metanólicos respectivamente, donde se encontró diferencia significativa en comparación de medias por prueba Tukey, ($p \geq 0.5$). Estos valores son superiores a lo reportados por Perales-Sánchez y col (2014) quien evaluó una harina germinada de amaranto quien obtuvo una CAox de 0.07 y 0.04 μ mol (ET) g^{-1} muestra (bs), para fitoquímicos libres y ligados respectivamente; una CAox total de 0.12 μ mol (ET) g^{-1} muestra (bs). Los

resultados obtenidos podrían ser comparados con frutos reconocidos por su capacidad antioxidante, Floegel y col (2011) reporto valores de CAox de 29.41 y 75.81 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs), para durazno y ciruela negra respectivamente. Así mismo estos valores entran dentro de los rangos reportados por Moo-Hunchin y col (2014) quienes evaluaron la CAox de 19 Frutos de Yucatán obteniendo un rango de 35.9-66.5 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs).

Para el método DPPH, se obtuvieron valores de CAox con diferencia significativa en comparación de medias por prueba Tukey, ($p \geq 0.5$), para fitoquímicos libres, así como en el Total de CAox en extractos etanólicos y metanólicos; para fitoquímicos libres fue 2.42 y 2.17 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs), CAox total fue de 9.54 y 9.23 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs), valores obtenidos para extractos etanólicos y metanólicos, en ambos casos respectivamente. Valores que podrían ser comparables con lo reportado por Takebayashi y col (2013) quién analizo 23 vegetales y 13 frutos, obteniendo un rango de CAox de 0.30 a 19.37 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs), entre ellos se analizó tomate y berenjena los cuales presentaron valores de 1.18 y 8.26 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs), respectivamente, utilizando como solvente de extracción una mezcla de hexano: diclorometano. Los resultados son superiores y a lo reportado por Almeida y col (2011), para frutos frecuentemente consumidos como piña y papaya, obteniendo una CAox de 1.33 y 2.24 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs), respectivamente, analizada en extractos metanólicos de dichos frutos. Así mismo los valores se encuentran dentro de los rangos reportados para 7 cultivares de Kiwi, donde la CAox fue de 5.80-17.23 $\mu\text{mol (ET) g}^{-1}$ muestra (bs), determinada en extractos etanólicos (Park y col 2014).

Por su parte, el CF obtenido en fitoquímicos libres fue de 1.10 y 1.02 mg equivalentes de ácido Gálico (EAG) g^{-1} muestra (bs); en fitoquímicos ligados de 1.79 y 1.79 mg (EAG) g^{-1} muestra (bs); el CFT fue 2.90 y 2.81 mg (EAG) g^{-1} muestra (bs); en extractos etanólicos y metanólicos respectivamente en todos los casos; donde se presentaron diferencias significativas entre las medias por el método de Tukey, ($p \geq 0.5$), tanto de fitoquímicos libres como en el CFT en los distintos extractos. Los valores obtenidos son comparables con lo reportado por Rodríguez y col (2014) quienes elaboraron una harina a partir de biomasa de microalga *Spirulina*, obteniendo un CFT de 0.55-1.05 mg (EAG) g^{-1} muestra (bs), evaluados en extractos acuosos. Los resultados son superiores a lo reportado por Perales-Sánchez y col (2014) quién obtuvo un CFT de 0.21 (EAG) g^{-1} muestra (bs), en harina germinada de amaranto, evaluada en extractos etanólicos. Y son comparables con lo reportado por Reyes-Moreno y col (2014), quienes elaboraron una harina a base de una mezcla de maíz y frijol, obteniendo un CFT de 3.85 (EAG) g^{-1} muestra (bs).

Las discrepancias entre los valores obtenidos en cuanto la CAox, así como CFT, desde el punto de vista alimenticio podría atribuirse a diversos factores; entre los más analizados son en cuanto los métodos aplicados (ORAC, ABTS, DPPH y CF) de los cuales se hace uso para realizar esta determinación, así como el tipo de solvente utilizado en la extracción de dichos compuestos (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto 2006; Floegel y col 2011).

E FORMULACION ÓPTIMA PARA LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FUNCIONAL A BASE DE BR DE *P. tricornutum*

En el Cuadro 12 se muestran las diferentes combinaciones de variables independientes [concentración de biomasa residual (CBR) y concentración de saborizante (CS)] utilizadas en las formulaciones empleadas para la elaboración de bebidas de valor nutricional/nutracéutico alto y los valores experimentales de las variables de respuesta [capacidad antioxidante (CAox) y aceptabilidad (A) sensorial de las bebidas].

1 Modelos experimentales de predicción

A partir de los datos experimentales de CAox y A de las formulaciones

Cuadro 12. Diseño experimental¹ empleado para obtener diferentes combinaciones de formulaciones. Relación entre cantidad de biomasa residual y saborizante (CBR, CS), para la producción de una bebida funcional a base de biomasa residual de la microalga *P. tricornutum* con alta capacidad antioxidante, y los resultados experimentales de las variables de respuesta (CAox, A)

Tratamiento ²	Variables de proceso ³		Variables de respuesta ⁴	
	CBR (g)	CS (g)	Capacidad Antioxidante (CAox) ⁵	Aceptabilidad A
1	1.32	0.44	54.13	52.13
2	7.68	0.44	429.80	45.57
3	1.32	2.56	188.12	64.90
4	7.68	2.56	763.95	51.48
5	0.00	1.50	117.37	68.05

6	9.00	1.50	737.61	45.69
7	4.50	0.00	304.42	13.72
8	4.50	3.00	566.19	47.12
9	4.50	1.50	356.34	51.70
10	4.50	1.50	358.44	51.00
11	4.50	1.50	358.46	51.43

¹Diseño central compuesto rotatable con dos factores y cinco niveles; 11 tratamientos.

²No corresponden al orden del proceso.

³**CBR**= Concentración de biomasa residual; **CS**= Concentración de saborizante

⁴**CAox**= Capacidad Antioxidante Total; **A**= Aceptabilidad

⁵μmoles equivalentes de Trolox (ET) en una porción de 300 mL.

mostrados en el Cuadro 12 se obtuvieron modelos de predicción, como resultado de ajustar el polinomio de la Figura 10, el cual relaciona las variables de respuesta (CAox y A) evaluadas a las formulaciones con las variables independientes (CBR y CS). A estos modelos de predicción se les probó su idoneidad y ajuste por análisis de varianza (ANOVA, Cuadro 12). Montgomery (2002) reportaron que un buen modelo de predicción debe tener una R^2 ajustada (coeficiente de determinación) ≥ 0.80 , un nivel de significancia de $p < 0.05$, un valor de coeficiente de varianza (CV) $\leq 10\%$, y prueba de falta de ajuste > 0.1 ; todos estos parámetros fueron usados para decidir el nivel de satisfacción del modelado.

a Capacidad antioxidante (CAox)

Las formulaciones presentaron valores de CAox entre 54.13 y 763.95 μmol (ET)/ 300 mL de muestra (Cuadro 12) correspondientes a los tratamientos 1 y 6,

respectivamente. En el Cuadro 13 se muestra la estimación de los coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos de predicción, mostrando las relaciones entre la capacidad antioxidante y la aceptabilidad y las variables independientes (CBR y CS) para la obtención de una formulación a base biomasa residual y saborizante para elaborar una bebida funcional. El análisis de varianza mostro un modelo lineal significativo ($p= 0.0001$) para Caox.

Este análisis mostro que la Caox de las formulaciones fue significativamente diferente en el término lineal concentración de biomasa residual (CBR) y concentración de saborizante (CS). El modelo de predicción para la Caox de las formulaciones usando variables codificadas fue: $CAox = +370.86 + 202.47X_1 + 65.87 X_2$

El modelo de predicción para la Caox de las formulaciones usando variables

Coeficientes	Capacidad antioxidante Caox		Aceptabilidad A	
	codificado	Sin codificar	Codificado	Sin codificar
Intercepto				
β_0	+370.86	-8.63	+51.43	+46.23
Lineal				
β_1	+202.47***	+63.63	-7.08***	-6.08
β_2	+65.87***	62.11	+7.35***	+24.93
Cuadrático				
β_{11}	NS	NS	+4.34**	+0.43
β_{22}	NS	NS	-6.75***	-5.99

P_{modelo}	0.0001	0.0005
P_{falta de ajuste}	0.1362	0.1956
CV	9.94	8.65
R²	0.9638	0.8999
R²_{ajustada}	0.9566	0.8499
R²_{predicha}	0.9273	0.6102

Cuadro 13. Coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos experimentales de predicción. Se muestra la relación entre las variables de respuesta (CAox, A) y variables del proceso (CBR, CS) para la elaboración de una bebida funcional a partir de biomasa residual de *P. tricornutum*

***Nivel de significancia a $p \geq 0.10$**

**** Nivel de significancia a $p \geq 0.05$**

***** Nivel de significancia a $p \geq 0.01$**

NS, No significativo

no codificado fue: **CAox = -8.63 + 63.63CBR + 62.11CS**

Este modelo de predicción explico el **95%** de la variabilidad total ($p=0.0001$) de los valores de Caox de las formulaciones. El coeficiente de determinación R² ajustada del modelo fue **0.9566** y la falta de ajuste fue no significativa ($p=0.1362$). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue de 9.94%. Estos valores indican que el modelo experimental para la Caox de las formulaciones fue adecuado y

reproducibile. A partir de los modelos matemáticos de predicción se construyeron gráficos de superficie de respuesta y de contornos (Figura 12) en las cuales se observa el efecto de las variables independientes CBR y CS sobre la capacidad antioxidante de las formulaciones. En los gráficos se observa que ambas variables de proceso (CBR y CS) tuvieron efecto significativo en el comportamiento de la capacidad antioxidante de las formulaciones.

El valor de Caox más bajo ($54.13 \mu\text{mol (ET)/ 300 mL}$ de muestra) se localizó a una CBR de 1.32 y una CS de 0.44 g. A medida que aumentaba tanto el contenido de biomasa residual como de saborizante la Caox aumentaba, esto podría ser debido a que la biomasa residual aporta gran contenido de antioxidantes. Es por ello que, los valores más altos de Caox se alcanzaron al tener los mayores porcentajes de biomasa residual en la formulación.

b Aceptabilidad (A) sensorial

Las bebidas funcionales elaboradas con las formulaciones presentaron valores de aceptabilidad entre 13.72 y 68.05 (**Cuadro 13**), valores correspondientes a “Me disgusta extremadamente” y “Me gusta moderadamente” en una escala LAM; estos valores se obtuvieron en los tratamientos 7 y 5 respectivamente. En el **Cuadro 14**

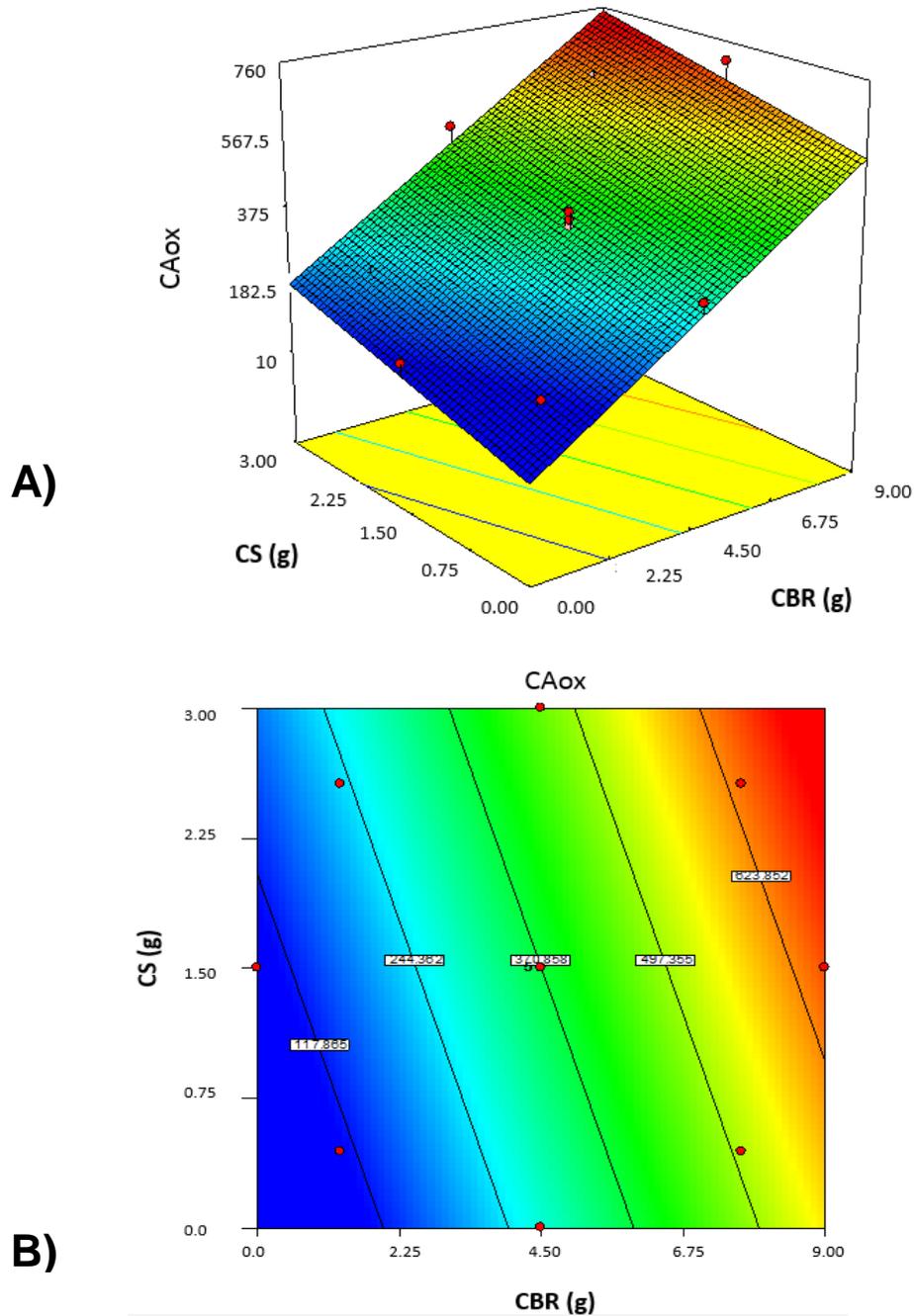


Figura 12. Graficas de superficie de respuesta y contornos para CAox. A, superficie de respuesta; B, contornos. Se muestra el efecto de las variables de proceso [CBR: concentración de biomasa residual, CS: concentración de saborizante] sobre la CAox ($\mu\text{mol ET}/300 \text{ mL}$) de las bebidas funcionales elaboradas con las formulaciones a base de biomasa residual y saborizante.

se muestra la estimación de los coeficientes de regresión y análisis de varianza del modelo de predicción para la aceptabilidad de las bebidas nutracéuticas elaboradas con las formulaciones, el cual muestra la relación entre las variables dependientes y las variables independientes (CBR y CS).

El análisis de varianza mostró un modelo cuadrático significativo ($p=0.0005$) para **A**. Este análisis también mostro que la aceptabilidad de las bebidas funcionales elaboradas con las formulaciones fue significativamente dependiente de los términos lineales concentración de biomasa residual (CBR) y concentración de saborizante (CS), así como de los términos cuadráticos (CBR^2 y CS^2) ($P<0.05$).

El modelo de predicción para la A de las formulaciones usando variables codificadas fue: $A = + 51.43 - 7.08X_1 + 7.35 X_2 + 4.34 X_1^2 - 6.75 X_2^2$

El modelo de predicción para la A de las formulaciones usando variables no codificado fue: $A = +46.23 - 6.08CBR + 24.93CS + 0.43CBR^2 - 5.99 CS^2$

Este modelo de predicción explicó el 95% de la variabilidad total ($p=0.0005$) de los valores de A de las bebidas funcionales elaboradas con las formulaciones. El coeficiente de determinación R^2 ajustada del modelo fue 0.8499 y la falta de ajuste no fue significativa (0.1956). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue de 8.65%. Estos valores indican que el modelo experimental para la A de las bebidas funcionales elaboradas fue adecuado y reproducible. A partir de los modelos matemáticos de predicción se construyeron gráficos de superficie de respuesta y de contornos (Figura 13) en las cuales se observa el efecto de las variables independientes (CBR y CS) sobre la A de las bebidas funcionales

elaboradas con las formulaciones. En los gráficos se observa que ambas variables de proceso

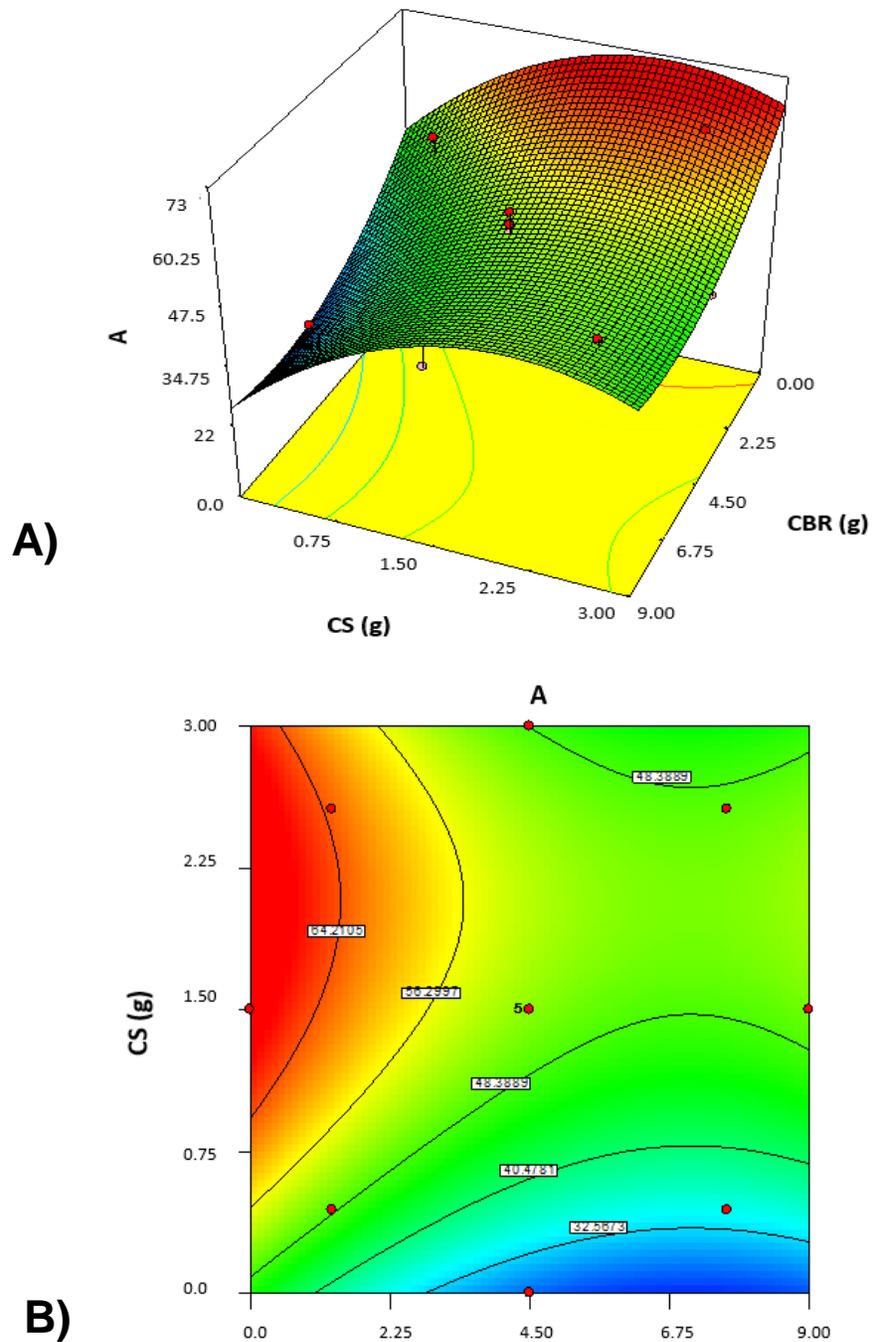


Figura 13. Graficas de superficie de respuesta y contornos para aceptabilidad (A). A) superficie de respuesta; B) contornos. Se muestra el efecto de las variables proceso [CBR: concentración de biomasa residual, CS: concentración

de saborizante] sobre la [A] de las bebidas funcionales elaboradas con las formulaciones a base de biomasa residual y saborizante.

(CBR y CS) tuvieron un efecto significativo en la aceptabilidad. El valor de A más bajo fue (13.72) se localizó a los valores de CBR y CS (4.5 y 0.0 g, respectivamente). A medida que la CS aumento, los valores de A también incrementaron hasta alcanzar un valor máximo posible (68.05), el cual se localizó en los valores de CBR y CS de 0.0 y 1.5 g, respectivamente. Sin embargo, a concentraciones altas de saborizante la CAox disminuyó significativamente.

2 Optimización

Se aplicó el método numérico de deseabilidad (**D**) para la obtención de formulaciones empleadas para elaborar una bebida de valor nutricional/nutracéutico alto (Formulación óptima= **FO**). Los modelos matemáticos de predicción obtenidos para cada una de las variables de respuestas se utilizaron para obtener las (**d_i**) de cada una de ellas (Figura 14), las cuales, a su vez, se utilizaron para calcular la deseabilidad global (**D**). Para la **FO**, se buscó maximizar las variables de respuesta (**CAox** y **A**) permaneciendo dentro del rango experimental la **CBR** y **CS**. El valor de deseabilidad (**D**) (Figura 15 [CAox y A]) obtenido durante la optimización de la formulación (**FO**) fue de 0.803. Los valores de las variables independientes asociados con la deseabilidad global obtenida fueron: **CBR**= 9 g y **CS**= 2.31 g. Esta combinación de variables independientes permitió obtener valores estimados de **CAox**= 707.616 μmol (ET)/300 mL de muestra y (**A**)= 51.78 valor que se encuentra entre “Ni me gusta, ni me disgusta” y “Me gusta ligeramente”.

Deseabilidad

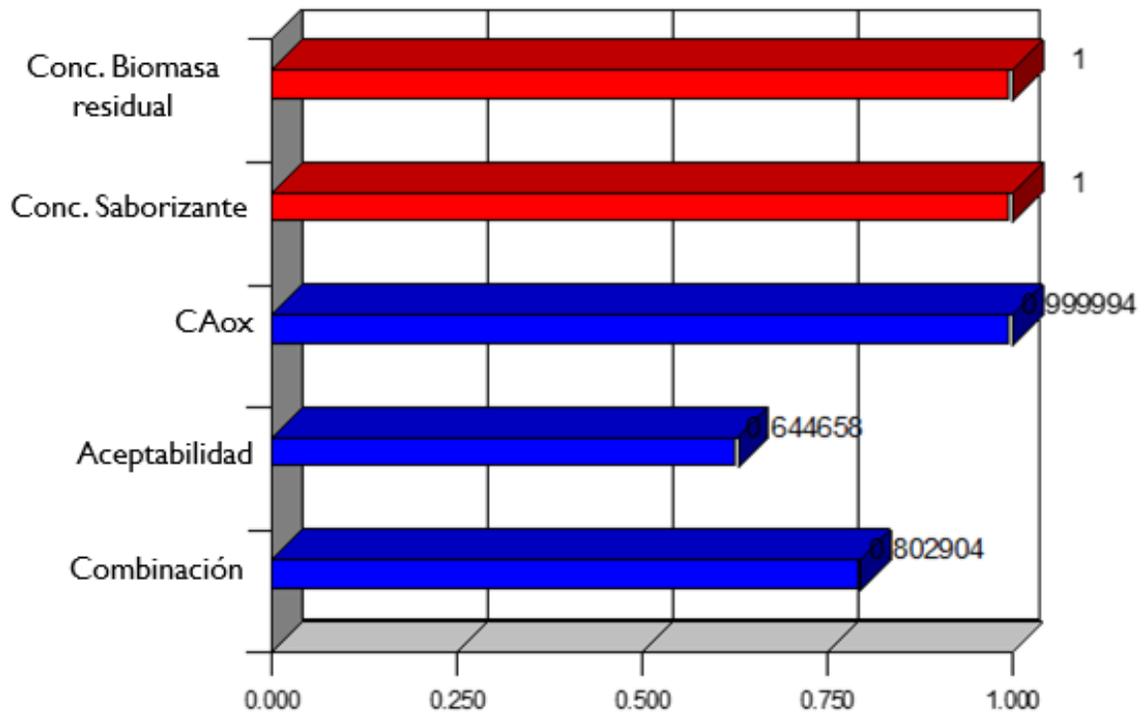


Figura 14. Gráficos de deseabilidades individuales (d_i) para cada una de las variables dependientes. Se muestra CAox= Capacidad antioxidante; A= Aceptabilidad obtenidas durante la optimización.

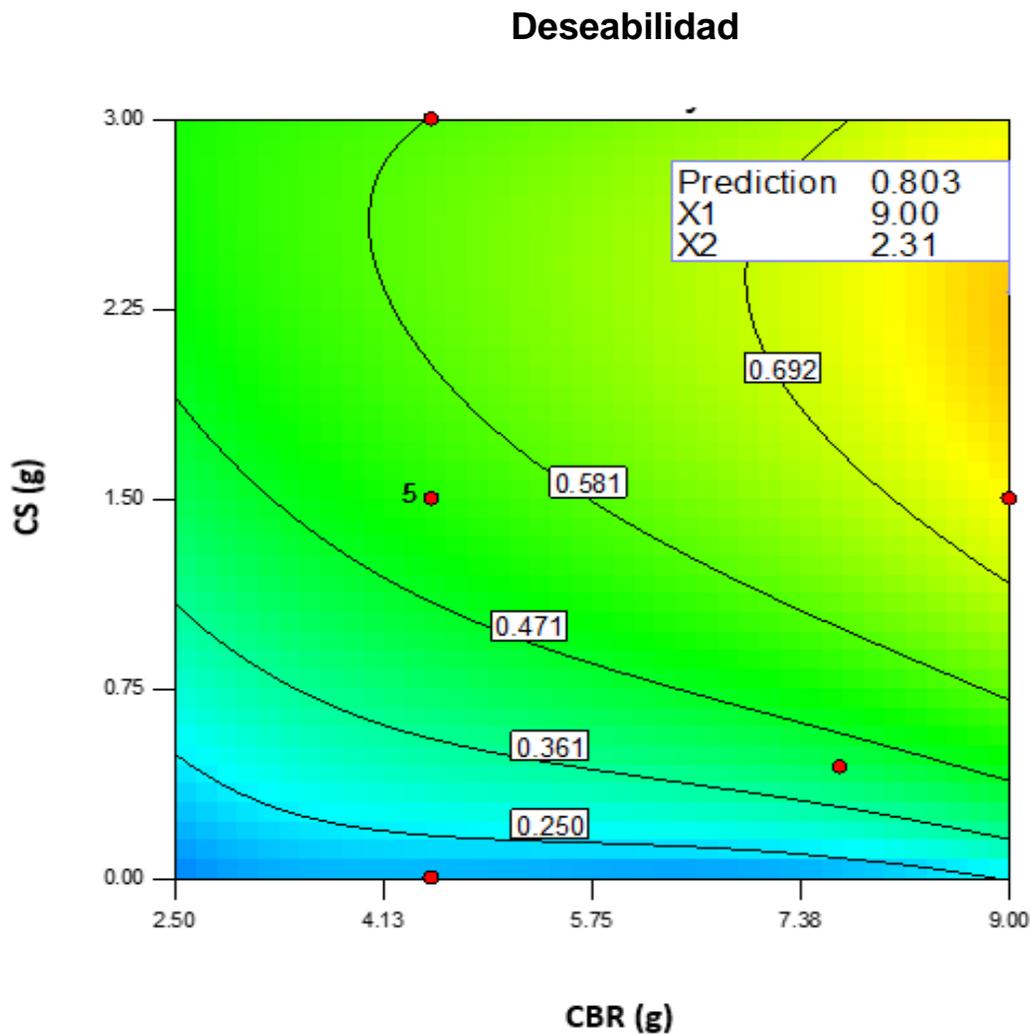


Figura 15. Gráfico de contornos de deseabilidad global (**D**). Se muestra el efecto de la concentración de biomasa residual (CBR) y concentración de saborizante (CS) sobre la deseabilidad global (**D**) de las variables de respuesta (CAox y A) empleadas para la optimización de formulaciones para la preparación de una bebida funcional con capacidad antioxidante y aceptabilidad sensorial altas: **FO**.

F COMPOSICIÓN QUÍMICA, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA FORMULACIÓN ÓPTIMA

En el Cuadro 14 se muestra la composición química de la formulación optimizada a base de biomasa residual de *P. tricornutum* y saborizante (CBR=9 y CS= 2.31 g), para la elaboración de una bebida funcional, así como su capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos. La formulación optimizada (**FO**) presento un contenido de proteínas de 30.13%, lípidos 0.85%, minerales 13.74%, carbohidratos 55.27%, fibra dietaría total 37.63%, de la cual un 2.54% fue de fibra soluble y 35.09% de fibra insoluble. La formulación de la bebida se basó en la preparación de bebidas tradicionales, así como pruebas sensoriales para definir las cantidades de los ingredientes utilizados. La norma mexicana **NMX-F-439-1983** para alimentos y bebidas no alcohólicas fue considerada.

Dichos valores podrían ser comparables con lo reportado en literatura de sobre algunas algunas formulaciones a partir de granos de cereales, seudocereales y leguminosas que han sido utilizados como ingredientes en la elaboración de bebidas funcionales (Faccin y col 2009; Luana y col 2015). Rochín-Medina y col (2015) optimizo una formulación a partir de una mezcla de maíz y garbanzo extrudidos, reportando una composición química de: proteínas 16.57%, lípidos 3.87%, minerales 3.32%, carbohidratos 76.24%.

Los valores son comparables con lo reportado por Reyes-Moreno y col (2014), quienes optimizaron la formulación de una mezcla de maíz QPM extrudido y frijol fermentado, para la elaboración de una bebida con potencial nutracéutico, obteniendo valores de proteínas de 17.64%, lípidos 3.82%,

minerales 1.16%, carbohidratos 77.38% y fibra dietaria total 24.75%. Así mismo los resultados pue-

Cuadro 14. Composición química, capacidad antioxidante y compuestos fenólicos presentes en la formulación optimizada (FO)

Propiedad	FO
Composición química (%bs)	
Proteínas	30.13 ± 0.35
Lípidos	0.85 ± 0.02
Cenizas	13.74 ± 0.03
Carbohidratos	55.27 ± 0.37
Fibra Dietaria Total	37.63 ± 0.17
Soluble	2.54 ± 0.01
Insoluble	35.09 ± 0.17
Capacidad antioxidante	
ORAC¹	
Fitoquímicos libres	5973.12 ± 131.20
Fitoquímicos ligados	9753.24 ± 204.11
Total	15185.95 ± 202.71
ABTS¹	
Fitoquímicos libres	2260.97 ± 62.72
Fitoquímicos ligados	4301.01 ± 75.38
Total	6561.98 ± 54.28
DPPH¹	
Fitoquímicos libres	496.03 ± 9.71
Fitoquímicos ligados	585.51 ± 7.00
Total	1044.38 ± 8.38
Compuestos fenólicos totales²	
Libres	77.51 ± 3.62
Ligados	107.39 ± 3.71
Total	184.90 ± 7.27

Los valores representan el promedio de tres réplicas \pm desviación estándar. ¹μmoles equivalentes de Trolox (TE)/ 100g de muestra, bs. ²mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ 100g de muestra, (bs).

den ser comparables con lo reportado por Milán-Carrillo y col (2012) quienes optimizaron un proceso de extrusión para obtener la formulación de una harina de amaranto para elaborar una bebida nutracéutica; la formulación extrudida de amaranto optimizada presentó una composición química de: proteínas 15.96%, lípidos 7.86%, minerales 3.17%, carbohidratos 60%, y fibra dietaria total 13.91%.

La **FO** presentó una CAox por el método de ORAC de 5973.12 y 9753.24 μmol ET/100g (bs), en cuanto fitoquímicos libres y ligados respectivamente; la capacidad antioxidante total (misma que se obtuvo a partir de la suma de fitoquímicos libres y ligados) en este método fue de 15185.95 μmol ET/100g muestra (bs). Estos valores podrían ser comparables con los rangos reportados por Ninfali y col (2014) para formulaciones de bebidas y jugos de frutas 422-4465 μmol TE/100g muestra (bs). Floegel y col (2011) reportaron valores de capacidad antioxidante para formulaciones de jugos de naranja y uva, así como té verde de 726, 2377 y 1253 μmol TE/100 g muestra (bs), respectivamente; siendo superiores los valores encontrados en el presente estudio.

Por el método ABTS, la **FO** presentó una CAox de 2260.97 y 2260.97 μmol TE/100 g muestra (bs), respectivamente; en cuanto a CAox total se obtuvo un valor de 6561.98 μmol TE/100g muestra (bs). Los resultados obtenidos son comparables a lo reportado para formulaciones de jugos de uva por Moreno-Montoro y col (2015) quien reportó un rango de capacidad antioxidante de 1940-3320 μmol TE/100g muestra (bs). Siendo superior a lo reportado por Magalhes y

col (2007) quienes reportaron CAox de 189, 223 y 549 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ muestra (bs), para formulaciones de infusiones herbales, jugos e infusiones de té, respectivamente.

En cuanto al método DPPH, la **FO** presentó una CAox de 496.03 y 496.03 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ muestra (bs), para fitoquímicos libres y ligados, respectivamente; y se obtuvo una CAox total de 1044.38 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ muestra (bs). Dichos valores podrían ser comparados con lo reportado en la literatura. Pisoschi y col (2009) analizó la CAox de algunas formulaciones de jugos; de limón, naranja y fruta fresca reportando valores de 925, 650, 400 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ muestra (bs), respectivamente. Diamantini y col (2015) reportaron un rango de CAox de 53-5400 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ muestra (bs), para bebidas energizantes.

El contenido de compuestos fenólicos (CF) que presentó la **FO** fue de 77.51 y 107.39 mg EAG/100g muestra (bs); mientras que el CFT fue 184.90 mg EAG/100g muestra (bs). Valores obtenidos en el presente estudio son superiores con lo reportado por Kim y col (2014), quienes analizaron 62 tipos de formulaciones de bebidas comerciales, entre ellas bebidas de: fresa, limón, mango, mandarina, reportando un CFT de 43.02, 15.30, 31.90 y 33.51 mg EAG/100g muestra (bs), respectivamente. Son comparables con lo reportado por Luana y col (2014), quienes reportaron un CFT de 78.28 mg EAG/100g muestra (bs) para la formulación de una bebida tipo yogurt de avena. Moreno-Montoro y col (2015) reportaron rangos de valores de CFT de 54.4-75.5, 28.9-102.0, 73.2 y 53.5-64.6 mg EAG/100g muestra (bs), para formulaciones de jugos de naranja, manzana, granada y uva, respectivamente.

G CONTENIDO NUTRIMENTAL Y ENERGETICO, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACEPTABILIDAD SENSORIAL DE LA BEBIDA FUNCIONAL OBTENIDA

El Cuadro 15 muestra la composición nutricional de la bebida elaborada a partir de la formulación optimizada a base de biomasa residual de *P. tricornutum* y

Cuadro 15. Contenido nutricional, capacidad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos, aporte calórico y aceptabilidad de la bebida funcional elaborada a partir de FO

Componente	Bebida funcional
Proteína	3.49 ± 0.40
Lípidos	0.09 ± 0.00
Minerales	1.59 ± 0.00
Carbohidratos	6.41 ± 0.04
Fibra Dietaria Total	4.36 ± 0.01
Soluble	0.29 ± 0.00
Insoluble	4.07 ± 0.01
Energía (Kcal)	47.7
Capacidad Antioxidante (µmol TE)	
ORAC	1717.53
ABTS	723.87
DPPH	118.12
Contenido Fenólicos Totales (mg EAG)	20.19
Aceptabilidad ¹	48
Aceptabilidad c/enmascarador de olor ¹	55

Resultados representan el promedio de tres réplicas ± desviación estándar.

¹Valores entre “Me disgusta ligeramente”- “Ni me gusta, ni me disgusta” y “Me gusta ligeramente” en escala LAM. kcal: kilocalorías; µmol TE: µmoles

equivalentes de Trolox; mg EAG: miligramos equivalentes de ácido Gálico, para una porción de 300 mL.

saborizante (CBR= 9 y CS= 2.31 g), así como su aporte calórico, capacidad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos y aceptabilidad. Una porción de 300 mL de la bebida de valor nutricional/nutracéutico alto elaborada a partir de la **FO** presentó un contenido de proteínas 3.49%, lípidos 0.09%, minerales 1.59%, carbohidratos 6.41%, fibra dietaria total 4.36%, de la cual la fibra soluble represento un 0.29% y fibra insoluble 4.07%, así como un aporte calórico de 47.7 kcal. Del contenido energético total de la bebida las proteínas representaron alrededor de 29.27%, los lípidos en un 16.98% y los carbohidratos 57.75%. Una dieta bien balanceada para niños debe disponer del 9-15% de la energía a partir de proteínas; 35-45% de lípidos y 45-55% de carbohidratos (Cerezal-Mezquita y col 2007). Con base a lo anterior, la bebida presentó un porcentaje energético proveniente de carbohidratos mayor (55.75%), lo cual es de esperarse debido a que la biomasa residual fue desengrasada, por lo tanto, al retirar los lípidos la composición proximal se ve afectada por lo que podría haber aumentado el porcentaje de carbohidratos. No obstante, el porcentaje de energía proporcionado de proteínas y lípidos de las bebidas, se encuentra dentro del intervalo recomendado por la Secretaría de Salud, acerca de que una porción de bebida de 200 mL no debe contener más de 140 kcal. Por otro lado, la cantidad de proteína recomendada a consumir por niños y niñas físicamente activos con edades entre 1-3 años y 4-8 años es de 13 y 19 g/día respectivamente (USDA,

2005). Una porción de 300 mL de la bebida preparada con la **FO** aporta el 26.84% y 18.37% del requerimiento diario de proteína para niños de 1-3 y 4-8 años, respectivamente.

Una porción de 300 mL de la bebida preparada con la (FO) a partir de biomasa residual de *P. tricornutum* y saborizante, aporta un contenido de CFT de 20.19 mg (EAG); y así mismo aporta una CAox determinada por métodos ORAC, ABTS y DPPH, de 1717.53, 723.87 y 118.21 μmol (ET).

El departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) recomienda una ingesta diaria de 3,000-5,000 μmol (ET)/día para mantener un nivel adecuado de antioxidantes en el organismo (USDA, 2010). Una porción de 300 mL de la bebida funcional elaborada a partir de la **FO** aporta entre el 57.25-34.35% de la ingesta diaria de antioxidantes recomendada.

Los valores de CAox obtenidos son superiores a lo reportado por Milán-Carrillo y col (2012) quien obtuvo 1161 μmol (ET) en una bebida elaborada a partir de la optimización de harina amaranto extrudido. Son comparables con lo reportado por Rochín-Medina y col (2015) quien obtuvo una CAox de 1,994 μmol (ET) en una bebida nutracéutica elaborada a partir de una mezcla de maíz y garbanzo. En el Cuadro 16 se muestran algunas bebidas funcionales así como sus características nutrimentales, antioxidantes, nutracéuticas, aporte calórico y aceptabilidad; mismas que pudieran ser comparables con la bebida funcional obtenida en la presente investigación.

Panelistas no entrenados evaluaron sensorialmente la bebida elaborada a partir de la **FO**, empleando una prueba hedónica con escala LAM (Labeled Affective Magnitude) para evaluar la aceptabilidad de las bebidas (Cardello y Schutz 2004).

Los panelistas emitieron como resultado de dicha evaluación, un valor de 48 para la bebida preparada a partir de la FO, valor que se encuentra entre “Me disgusta ligeramente” y “Ni me gusta, Ni me disgusta” en una escala hedónica de 11 puntos. Con la finalidad de aumentar la aceptabilidad antes mencionada, se añadió un enmascarador de olor, realizando una nueva evaluación. Los panelistas emitieron

Cuadro 16. Composición nutrimental, capacidad antioxidante, contenido de fenólicos, aporte calórico y aceptabilidad de bebidas funcionales

Componente	Bebida funcional				
	BR microlaga	Arroz	Maíz-garbanzo	Avena	Amaranto
Proteína	3.49	3.45	4.96	NR	4.74
Lípidos	0.09	8.64	1.15	NR	1.63
Minerales	1.59	3.33	NR	NR	1.15
Carbohidratos	6.41	25.92	29.25	NR	26.08
Fibra Dietaria Total	4.36	NR	NR	13.95	3.75
Soluble	0.29	NR	NR	3.03	1.26
Insoluble	4.07	NR	NR	10.92	2.49
Energía (Kcal)	47.7	195.24	147	NR	137.95
Capacidad Antioxidante (µmol TE)					
ORAC	1717.53	NR	2991	NR	1161
ABTS	723.87	NR	NR	NR	NR
DPPH	118.12	NR	NR	NR	NR
Contenido Fenólicos Totales (mg EAG)	20.19	NR	NR	46	17.37
Aceptabilidad ¹	48	NR	86	NR	84
Aceptabilidad c/enmascarador de olor ¹	55	60	NR	NR	NR

¹Valores entre “Me disgusta ligeramente” y “Me gusta extremadamente” en escala LAM. kcal: kilocalorías; $\mu\text{mol TE}$: $\mu\text{moles equivalentes de Trolox}$; mg EAG: miligramos equivalentes de ácido Gálico. Valores para una porción de 300 mL. NR- No reportado. Tomado de Faccín y col (2009); Milán-Carrillo y col (2012); Launa y col (2014); Rochín-Medina y col (2015); Félix-Medina (2015).

como resultado de dicha evaluación, un valor de 55 para la bebida preparada a partir de la **FO** con enmascarador de olor, valor que se encuentra entre “Ni me gusta, Ni me disgusta” y “Me gusta ligeramente”.

IX CONCLUSIONES

1. El cultivo de *P. tricornutum* presentó un comportamiento sigmoideal típico de microorganismos; mostrando la mayor densidad celular en el día 11 con un conteo de 9.8×10^6 cel/mL y DO_{677nm} 0.72.
2. El quitosano mostró ser un floculante orgánico eficiente en la colecta de la BM de *P. tricornutum*, al obtenerse valores de eficiencia de floculación importantes sobre todo a pH alcalinos entre 95.42-100%.
3. La BR de *P. tricornutum* conservó altos contenidos de proteínas (36.67%) y carbohidratos (46.78%) destacando estos últimos, de los cuales el contenido de fibra dietaría total fue 45.57% (fibra soluble 2.02% y fibra insoluble 43.54%).
4. El CFT y carotenoides presentes en la BM y BR fue significativo, lo que podría estar contribuyendo a su elevada CAox, la cual fue superior a algunos frutos considerados como fuente importante de antioxidantes en la dieta humana.
5. Una porción de 300 mL de bebida funcional preparada a partir de la FO contiene 3.49 g de proteínas, 0.09 de lípidos, 1.59 g de minerales, 6.41 g de carbohidratos, de los cuales contiene 4.36 g de fibra dietaría total (0.29 g fibra

soluble y 4.07 g fibra insoluble); un contenido energético de 47.7 kcal, una Caox de 1717.53, 723 y 118.12 μmol TE por métodos ORAC, ABTS y DPPH; así como un contenido de CFT de 20.19 mg EAG.

6. Una porción de 300 mL de la bebida preparada con la FO aporta el 26.84% y 18.37% del requerimiento diario de proteína para niños de 1-3 y 4-8 años, respectivamente. Además, aporta entre el 34.35-57.25% de la ingesta diaria de antioxidantes recomendada.
7. El uso de un enmascarador de olor en la preparación de la bebida funcional, logró incrementar su A de un valor de 48 a 55 en una escala hedónica de 11 puntos, colocándola entre “Ni me gusta, Ni me disgusta” y “Me gusta ligeramente”.

X BIBLIGRAFÍA

AACC 2007. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. St. 9° ed. St Paul, MN, EUA.

Abdel-Aal ESM, Young JC, Rabalski I, Hucl P, Fregeau-Reid J. 2007. Identification and quantification seed carotenoids in selected wheat species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 787-794.

Acién-Fernández FG, Hall DO, Guerrero EC, Rao KK, Grima EM. 2003. Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor. Journal of Biotechnology 103: 137- 152.

ADA [American Dietetic Association]. 2009. Position of the American Dietetic Association: functional foods. Journal American Dietary Association 109:735-46.

Adom KK y Liu RH. 2002. Antioxidant activity of grains. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 6182-6187.

Ahmad AL, Mat Yasin, NH, Derek CJC, Lim JK. 2011. Optimization of microalgae coagulation process using chitosan. Journal Chemistry Engineering 173: 879–882.

Ahmed F, Fanning K, Netzel M, Turner W, Li Y, Schenk PM. 2014. "Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters". *Food Chemistry* 165: 300-306.

Ahmed F, Yan Li y Peer M Schenk. 2012. Algal biorefinery: Sustainable production of biofuels and aquaculture feed. En: *The Science of Algal Fuels: Phycology, Geology, Biophotonics, Genomics and Nanotechnology*. (Eds) R. Gordon & J. Seckbach. Dordrecht, Springer Science, New York p 23-41.

Alam F, Date A, Rasjidin R, Mobin S, Moria H. 2012. Biofuel from microalgae- is it a viable alternative? *Procedia Engineering* 49: 221-227.

Almeida MMB, De Sousa PHM, Arriaga AM, Do Prado G M, Magalhaes CE, Maia GA, Lemos TL. 2011. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International* 44: 2155-2159.

Amaro HM, Guedes A C, Malcata FX. 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy* 88: 3402-3410.

Antony RJ, Ellis JT, Satihis A, Rahman A, Miller CD, Sims RC. 2013. Effect of coagulant/flocculants on bioproducts from microalgae. *Bioresource Technology* 149: 65-70.

AOAC. 1999. *Official Methods of Analysis*, 16th edn. Assotiation of Official Analytical Chemists, Washington. D.C. EUA.

Arias-Peñaranda MT, Roldan MJ, Cañizares RO. 2013. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros de cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biología Colombiana* 18: 43-68.

Aruoma O. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal Ambient Oil Chemistry Society* 75:199-212.

Atlic A, Koller M, Scherzer D, Kutschera C, Grillo Fernandes E, Horvat P, Chiellini E, Brauneegg G. 2011. Continuous production of poly ([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriadus necator* in multistage bioreactor cascade. *Applied Microbiology Biotechnology* 91: 295-304.

Babu B, y Wu JT. 2008. Production of natural butylated hydroxytoluene as an antioxidant by freshwater phytoplankton. *Journal Phycology* 44:1447–1454.

Bacellar M, Vermelho A. 2013. Allelopathy as a potential strategy to improve microalgae cultivation. *A review of Biotechnology for Biofuels* 6:152-158.

Balat M. 2011. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production: a review. *Energy conversion and management*. 52: 1479-1492.

Balboa EM, Conde E, Moure A, Falque E, Domínguez H. 2013. In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry* 138:1764–1785.

Barba FJ, Esteve MJ, Frigola A. 2014. Bioactive components from leaf vegetable products. *Studied Naturals Products Chemistry* 41: 321-346.

Barba FJ, Grimi N, Vorobiev E. 2015. New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. *Food Engineering Review* 7: 45-62.

Barros AI, Goncalves AL, Simoes M, Pires JC. 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41: 1489-1500.

Batista AP, Nunes MC, Fradinho P, Gouveia L, Sousa I, Raymundo A, Franco JM. 2012. Novel foods with microalgal ingredients— effect of gel setting

conditions on the linear viscoelasticity of *Spirulina* and *Haematococcus* gels. *Journal Food Engineering* 110:182–189.

Batista AP, Gouveia L, Bandarra NM, Franco JM, Raymundo A. 2013. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for products. *Algal Research* 2: 164-173.

Becker EW. 1988. Micro-algae for human and animal consumption. En: Borowitzka MA LJ, Eds. *Micro-algal technology*. Cambridge University Press p 222-56.

Becker EW. 2004. Microalgae in human and animal nutrition. En: Richmond A, Eds. *Handbook of microalgal culture 2da ed* Oxford: Blackwell Publishing p 312-51.

Becker EW. 2013. Microalgae for human and animal nutrition. En:

Richmond A, Hu Q. Eds. *Handbook of microalgal culture: Applied phycolgy and biotechnology*, 2da edición. Wiley-Blackwell, Oxford p. 461-503.

Benavides AM, Torzillo G, Kopecký, Masojídek. 2013. Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass and Bioenergy* 54:115-122.

Ben-Amotz, A. 2009. Bio-fuel and CO2 capture by algae. ANR meeting on «Third Generation Biofuels» - February, 5th ed. Paris, France.

Betancur-Ancona D, Martínez-Rosado R, Corona-Cruz A, Castellanos-Ruelas A, Jaramillo-Flores ME, Chel-Guerrero L. 2009. Funtional propiedades of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. *Journal of Food Science and Technology* 44: 128-137.

Bishop WM, Zubeck HM. 2012. Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *Journal Nutrition Food Sciences* 2:147-152.

Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.

Borowitzka MA, Volcani BE. 1978. The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricornutum* - ultrastructure of its morphotypes. *Journal of Phycology* 14: 10-21.

Borowitzka MA. 2013. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal Applied Phycology* 25:743-756.

Bowler C, Allen AE, Badger JH. 2008. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456: 239-244.

Brand-Williams W, Cuvelier E, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie* 28: 25-30.

Brennan L, Owende P. 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:557-577.

Burja A, Radianingtyas H. 2008. Nutraceuticals and functional foods from marine microbes: an introduction to a diverse group of natural products isolated from marine macroalgae, bacteria, fungi, and cyanobacteria, En: C.J. Barrow, F. Shahidi Eds. *Marine Nutraceuticals and Functional Foods*, CRC Press, Boca Raton p 367–403.

Cao G, Alessio HM, Culter RG. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 14:303-311.

Cardello AV, Schutz HG. 2004. Research note numerical scale-point locations for constructing the LAM (labeled affective magnitude) scale. *Journal of Sensory Studies* 19: 341-46.

Crezal-Mezquita P, Carrasco-Verdejo A, Pinto-Tapia K, Romero-Palacios N y Arcos-Zavala R. 2007. Suplemento alimenticio de alto contenido protéico para niños de 2-5 años. Desarrollo de formulación y aceptabilidad. *Interciencia* 32: 857-864.

Ceón-García MC, Sevilla FJM, Acién-Fernández FG, Grima EM, Camacho FG. 2000. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology* 12: 239–248.

Chacón-Lee T, González G. 2010. Microalgae for “Healthy” Foods Possibilities and Challenges. *Comprehensive in Institute of Food Technologists* 9: 655-675.

Chen CY, Yeh KL, Alsyah R, Lee DJ, Chang JS. 2011. Cultivation photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Technology* 102:71–81.

Chini-Zittelli G, Rodolfi L, Biondi N, Tredicci NR. 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* 261:932-943

Chisti F. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294–306.

Chisti, Y. 2011. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*. 26: 294-306.

Choochote W, Suklampoo L, Ochaikul D. 2014. Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. *Journal Applied Phycology* 26: 43-48.

Cofrades S. 2013. Design of healthier foods and beverages containing whole algae. En: Dominguez H, editor. *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*. 19^a ed. New York: Elsevier 633 p.

Connan S, y Stengel DB. 2011. Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 2. Interactive effects on phenolic pool and assessment of metal binding capacity of phlorotannin. *Aquatic Toxicology* 104:1–13.

Contreras-Jiménez B, Morales-Sánchez E, Reyes-Vega ML, Gaytán-Martínez M. 2014. Functional properties of extruded corn flour obtained at low temperature. *Journal of Food* 12: 263-270

Corbo MR, Bevilacqua A, Petruzzi L, Casanova FP, Sinigaglia M. 2014. Functional beverages: The energing side of functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Sciencen and Food Safety* 13: 1192-1206.

De la Vara SR, Dominguez DJ. 2002. Métodos de superficie de respuesta; un estudio comparativo. *Revista de Matemáticas: Teoría y Aplicaciones* 1: 47-65.

Desbois AP, Mearns-Spragg A, Smith VJ. 2009. A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including Multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology* 11: 45-52.

Diamantini G, Pignotti S, Antonini E, Chiarabini A, Agelino D, Ninfali P. 2015. Assessment of antioxidant capacity of energy drinks, energy gels and sport drinks in comparison with coffee and tea. *International Journal of Food Science and Technology* 50: 240–248.

Dimitrios B. 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. Trends in Food Science and Technology 17: 505-512.

Doble M, Gummadi SN. 2007. Cell growth and product formation. En: Doble M, Gummadi SN. Eds. Biochemical Engineering. New Delhi, India. Prentice-Hall p 118-135.

Dragone G, Fernandes B, Vicente AA, Teixeira JA. 2010. Third generation biofuels from microalgae. Eds. Formatex Research Center. 2^a Edition. Portugal p 1355-1366.

Egardt J, Lie O, Aulie J, Myhre P. 2012. A market analysis carried out as part of the Interreg KASK IVA project: Blue Biotechnology for Sustainable Innovations. Disponible en: www.bluebio.org. Consultado el 30 agosto de 2015.

Ehizae AE, Sean C, Zhifa S, Carrington G. 2009. Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol codigested microalgae biomass. Global Change Biology Bioenergy 1:371–381.

Faccin GL, Vieira LN, Miotto LA, Barreto PLM, Amante ER. 2009. Chemical, sensorial and rheological properties of a new organic rice bran beverage. Rice Science 16: 226-234.

Faraid MS, Shariati A, Badakhshan A, Anvaripour B. 2013. Using nano-chitosan for harvesting microalga *Nannochloropsis sp.* Bioresource Technology 131: 555-559.

Floegel A, Kim DK, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. Journal of Food Composition and Analysis. 24: 1043-1048.

Francius G, Tesson B, Dague E, Martin-Jezequel V, Dufrene YF. 2008. Nanostructure and nanomechanics of live *Phaeodactylum tricornutum* morphotypes. Environmental Microbiology 10: 1344-1356.

Fukumoto LR, Mazza G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. Journal Agricultural Food Chemistry 48: 3597-3604.

Garibay-Hernández, A Vázquez-Duhalt, R, Sánchez-Saavedra MP, Serrano Carreón L, Martínez Jiménez A. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. Biotecnología 13: 703-726.

Gerde JA, Yao L, Lio JY, Wen Z, Wang T. 2014. Microalgae flocculation: impact of flocculant type, algae species and cell concentration. Algal Research. 3: 30-35.

Ghribi AM, Sila A, Przybylski R, Nedjar-Arroume N, Makhoul I, Blecker C, Attia H, Dhulster P, Bougatef A, Besbes S. 2015. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*cicer arietinum* L.) protein concentrate. Journal of Functional Foods 12: 516-525.

Gody-Hernández G, Vázquez-Flota FA. 2006. Growth measurements. Estimation of cell division and cell expansion. En: Methods in Molecular Biology, 318: Plant cell culture protocols. Eds. Humana press Inc. 2th Ed. Totowa, NJ p 51-58.

GoirisK, Colen WV, Wilches I, León-Tamariz F, De Cooman L, Muylaert K. 2015. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. Algal Research 7: 51-57.

Goiris K, Muylaert K, Fraeye I, Foubert I, De Brabanter JD, De Cooman L. 2012.

Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal Applied Phycology* 24: 1477-1486.

Gotham IJ, Rhee G J. 1982. Effects of nitrate and phosphate limitation on cyclostat growth of two freshwater diatoms. *Journal of General Microbiology* 128:199-205.

Gouveida L, Corvo L, Pinto R, Sampaio C, Lima BN, Batista AP, Sousa I, Bandarra NN. 2010. Microalgae biomass colourings 2. Toxicological evaluation, pigments in Food- Chemical, Biological and Technological Aspects p 199-201.

Gouveida L, Batista AP, Sousa IJ, Bandarra NN, Raymundo A. 2006. J empis, *Chlorella vulgaris* and *Hematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research and Technology*. 222: 362-367.

Gouveida L, Coutinho C, Mendonca E, Batista AP, Sousa IJ, Bandarra NN, Raymundo A. 2008. Sweet biscuits with *Isochysis galbana* microalga biomass as a functional ingredient. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 891-896.

Gualteri P, Barsanti L, Passarelli V. 1988. Harvesting *Euglena gracilis* cells with a nontoxic flocculant. *Journal Microbiology Methods* 8: 327-332.

Guillard RR, Ryther JH. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. Journal of Microbiology* 8: 229-239.

Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX. 2011. Microalgae as sources of high added value compounds-A brief review of recent work. *Biotechnology Program* 27:597-611.

Guedes AC, Malcata FX. 2012. Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture. En: Muchlisin, ZA. Eds. *Aquaculture* Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/aquaculture/nutritional-value-and-uses-of-microalgae-in-aquaculture>.

Guedes CA, Amaro HM, Sousa-Pinto I, Malcata FX. 2014a. Applications of spent biomass. En: pandey A, Lee DJ, Chisti Y, School C. Eds. *Biofuels from algae*. Elsevier p 205-220.

Guedes CA, Amaro MH, Gao SM, Malacata XF. 2014b. Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. *Food Chemistry* 138: 638–643.

Guil-Guerrero JL, Navarro-Juárez R, López-Martínez JC, Campra-Madrid P, Reboloso-Fuentes MM. 2004. Functional properties of the biomass of three microalgal species. *Journal of Food Engineering*. 65: 511-517.

Hajmahmoodi M, Faramarzi M, Mohammadi N, Soltani N, Reza OM, Nafissi-Varcheh N. 2010. Valuation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal Applied Phytochemical* 22:43–50.

Halliwell B.1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications* 9: 1-32.

Handelman GJ. 2001. The evolving role of carotenoids in human. *Biochemistry Nutrition* 17: 818-825.

Harun R, Singh M, Forde GM, Danquah MK. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:1037–1047.

Hosikian A, Lim S, Halim R, Danquah MK. 2010. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering*. DOI:10.1155/2010/391632.

Hu Q, Zarmi Y, Richmond A. 1998. Effects of light intensity, light path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *European Journal Phycology* 33: 165–171.

Hu Q, Sommerfeld M, Jarcis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production; perspectives and advances. *Plant Journal*. 54: 621-639.

Hung D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856.

Huang G, Chen F, Wei D, Zhang XW, Chen G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy* 87: 38-46.

Hudek K, Davis LC, Ibbini J, Erickson L. 2014. Commercial products from algae, En: R. Bajpai, A. Prokop, M. Zappi Eds. *Algal Biorefineries*, Springer Science, New York p 275–295.

Ibañez E, y Cifuentes A. 2013. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 703–709.

Ismail MM, El-Ayouty YM, Piercey-Normore MD. 2014. Antioxidants characterization in selected cyanobacteria *Microbiology* 64: 1223-1230.

Kanu PJ, Kanu BJ, Sandy HE, Bandeh BA, Mornay MP, and Huiming Zhou. 2009. Optimization of enzymatic hydrolysis of defatted sesame flour by different proteases and their effect on the functional properties of the resulting protein hydrolysate. *American Journal of Food Technology* 4: 226-240.

Kaixian Q, Borowitzka MA. 2003. Light and nitrogen deficiency effects on the growth and composition of *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 38: 93-103.

Khuri AI y Cornell JA. 1987. *Response surfaces: designs and analyses*. 1^a ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 405 p.

Kim DB, Shin GH, Lee YJ, Lee JS, Cho JH, Baik SO, Lee OH. 2014. Assessment and comparison of the antioxidant activities and nitrite scavenging activity of commonly consumed beverages in Korea. *Food Chemistry* 151:58–64.

Kim J, Lei XE. 2014. Potential of a defatted microalgal biomass as an iron source for hemoglobin repletion, *FASEB* 28:828.8.

Kim SS, Ly HV, Kim J, Lee EY, Woo HC. 2015. Pyrolysis of microalgae residual biomass derived from *Dunaliella tertiolecta* after lipid and carbohydrate saccharification. *Chemical Engineering Journal*. 263: 194-199.

Kim M, Yung YJ, Kwon ON, Cha KH, Um BH, Chung D, Pan CH. 2012. A potencial commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Biochemical Biotechnology* 166:1843-1855.

Koller M, Salerno A, Tuffner, Koinigg M, Böchzelt H, Schober S, Pieber S, Schnitzer H, Mittelbach M, Braunegg G. 2012. Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: a review. *Journal of Cleaner Production* 37: 377-388.

Koller M, Salerno, A, Miranda de Sousa Dias, M, Reiterer, A, Braunegg, G. 2009. Application of micro algae: combining the removal of pollutants to the formation of high-value products. *Biology Italy* 11: 30-34.

Klejdus B, Lojkva L, Plaza M, Snobloma M, Sterbova D. 2010. Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1217:7956-7965.

Kloareg B, y Quatrano, RS. 1988. Structure of the cell wall of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology and Annual Review* 26: 259–315.

Knuckey RM, Brown MR, Robert R, Frampton DMF. 2006. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aqua culture feeds. *Aquaculture Engineer* 35: 300-313.

Lardon L, Hélias A, Sialve B, Steyer JP, Bernard O. 2009. Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environmental Society Technology* 43:6475–6481.

Larkum AWD, Ross LI, Kruse O, Hankamer B. 2012. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends in Biotechnology* 30: 198-205.

Luana N, Rossana C, Curiel J, Kaisa P, Marco G, Rizzello C. 2014. Manufacture and characterization of yogurt-like beverage made with oat flakes fermented by selected lactic acid bacteria. *Journal of Food Microbiology* 185: 17-26.

Lee E, Heng, RL, Pilon L. 2013. Spectral optical properties of selected photosynthetic microalgae producing biofuels. *Journal Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 114: 122–135.

Lee OK, Kim AL, Seong DH, Lee CG, Jung YT, Lee JW, Lee EY. 2013. Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* 132: 197-201.

Lee RE. 2008. Basic characteristics of the algae. En: *Phycology*, Eds. Cambridge University Press Lee RE. 4th edition. New York. USA. p 3-27.

Li H, Cheng K, Wong C, Fan K, Chen F, Jiang Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* 102: 771–776.

Li Y, Hua D, Zhang J, Zhao Y, Xu H, Liang X, Zang X. 2013. Volatile fatty acids distribution during acidogenesis of algal residues with pH control. *World Journal Microbiology Biotechnology* doi 10.1007/s11274-013-1270-z.

Li Y, Wang B, Wu N, Lan CQ. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81: 629-636.

Lim U, Subar AM, Mouw T, Hartge P, Morton LM, Stolzenberg R, y col. 2006. Consumption of aspartame-containing beverages and incidence of hematopoietic and brain malignancies. *Cancer Epidemiology Biomarkers Previous* 15:1654-1659.

Liu J, Huang J, Chen F. 2011. Microalgae as feedstocks for biodiesel reduction. In *Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies*. Edited by Stoytcheva M. Croatia: In Technology 58–78.

Liu J, Tao Y, Wu J, Zhu Y, Gao B, Tang Y, Li A, Zhang C, Zhang Y. 2014. Effective flocculation of target microalgae with self-flocculating microalgae induced by pH decrease. *Bioresource Technology* 167: 367-375.

Lodi A, Binaghi L, de Faveri D, Carvalho JCM, Convert A, 2005. Fed-batch mixotrophic cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyceae) with carbon source pulse feeding. *An. Microbiology* 55:181e185.

Loera-Quezada MM, Olguín EJ. 2010. Oleaginous microalgae as source of biodiesel challenges and opportunities. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 1:91-116.

López A, Rico M, Rivero A, De Tangil MS. 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry* 125: 1104-1109.

Magahaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC, Tóth IV, Rangel AOSS. 2007. Automatic flow system for sequential determination of ABTS•+ scavenging capacity and Folin-Ciocalteu index: A comparative study in food products. *Analytica Chimica Acta* 592: 193-201.

Majer S, Mueller-Langer F, Zeller V, Kaltschmitt M. 2009. Implications of biodiesel production and utilization on global climate - a literature review. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111: 747-762.

Marxen K, Vanselow KH, Lippemeier S, Hintze R, Ruser A, Hansen UP. 2007. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some

microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors* 7: 2080-2095.

Mata TM, Martins AA, Caetano NS. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14: 217-232.

Mata TM, Martins AA, Caetano NS. 2012 Microalgae processing for biodiesel production. *Woodhead Publishing Series in Energy* 39: 204-231.

Mercado-Pedraza EB, Morales-Sánchez E, Reyes-Vega M, Gaytan-Martinez, Moody JA. 2013. Effects of a low-shear transport system on the physicochemical characteristics of nixtamal corn flour. *Journal of Food Processing and Preservation* ISSN 1745-4549.

Metha SK, Gaur, JP. 2005. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Critical Review Biotechnology* 25: 113-152.

Mikschofsky H, Hammer M, Schmidtke J, König P, Keil G, Schirrmeier H, Schmidt K, Broer I. 2009. Optimization of growth performance of freshly induced carrot suspensions concerning PMP production. *In Vitro Cellular. Developed Biology Plant* 45: 740–749.

Milán-Carrillo J, Montoya-Rodríguez A, Gutiérrez-Dorado R, Perales-Sánchez X, Reyes-Moreno C. 2012. Optimization of extrusión process for producing high antioxidant instant amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) flour using response surface methodology. *Applied Mathematics* 3: 1516-1525.

Milán-Carrillo J, Reyes-Moreno C, Camacho-Hernández IL, Rouzaud-Sandez O 2002. Optimization of extrusion process to transform hardened chickpeas

(*Cicer arietinum* L) into a useful product. *Journal of Science of Food and Agriculture* 82: 1718-1728.

Millegge JJ. 2011. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Rev Environmetal Society Biotechnology* 10:31–41.

Montoya-Rodríguez A. 2011. Nuevos Productos Alimenticios a Partir de Amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*) Integral. Efecto del Proceso de Extrusión/Cocción sobre la Capacidad Antioxidante y Niveles de Fitoquímicos [Tesis de maestría]. Sinaloa, México: Universidad Autónoma de Sinaloa. 110 p.

Moo-Huchin VM, Estrada-Mota I, Estrada-León R, Cuevas-Glory L, Ortiz-Vázquez E, Vargas ML, Betancur-Ancona D, Sauri-Duch E. 2014. Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, México. *Food Chemistry* 152: 508-515.

Moreno-Montoro M, Olalla-Herrera M, Gimenez-Martinez R, Navarro-Alarcon M, Rufián-Henares JA. 2015. Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis* 38: 19–26.

Morist A, Montesinos J, Cusido J, Godia F. 2001. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*. 37:535–547.

Montgomery DC. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana Cop. Mexico, DF p 45-85.

Mora–Escobedo R. 1994. Germinación de amaranto: características fisicoquímicas, funcionales y nutricionales. Tesis presentada para obtener el

grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Alimentos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional 140 p.

Mora-Rochín S, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO, Sánchez-Peña P, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal Cereal Science*, 52: 502-508.

Mussnug JH, Klassen V, Schuler A, Kruse O. 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology* 150: 51-56.

Mutanda T, Ramesh D, Karthikeyan S, Kumari S, Anandraj A, Bux F. 2011. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology* 102: 57-70.

Narváz-Cuenca CE, Mateus-Gómez A, Restrepo-Sánchez LP. 2014. Antioxidant capacity and total phenolic content of air-dried cape gooseberry (*Physalis peruviana* L) at different ripeness stages Postharvest Physiology and Technology 32: 232-237.

Nigam PS, Singh A. 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science* 37: 52-68.

Ninfali P, Chiarabini A, Angelino D. 2014. The ORAC/kcal ratio qualifies nutritional and functional properties of fruit juices, nectars, and fruit drinks. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 65: 708-712.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4619-26.

Palencia MY. 2002. Que son los alimentos funcionales. Curso Medicina Naturista. Disponible en: http://www.unizar.es/med_natirista/Alimentos%20funcionales.pdf. Consultado en Marzo de 2014.

Palou A y Serra F. 2000. Perspectivas europeas sobre alimentos funcionales. *Alimentación, Nutrición y Salud* 7: 76-90.

Pannala AS, Sigh S y Rice E C. 1998. Flavonoids as peroxynitric scavengers. *Methods in Enzymology* 299: 207-235.

Papazi A, Makridis P, Divanach P. 2010. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. *Journal Applied Phycology* 22:349–355.

Park S, Li Y. 2012. Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste. *Bioresource Technology* 111: 42-48.

Park S, Namiesnik J, Vearasilp K, Leontowicz H, Leontowicz M, Barasch D, Nemirovski A, Trakhtenberg S, Gorinstein S. *Food Chemistry* 165: 354-361.

Plaza M, Amigo M, Ibañez E, Del Castillo MD, & Herrero M. 2010. Neofornation of antioxidants in glycation model systems treated under subcritical water extraction conditions. *Food Research International* 43: 1123–1129.

Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. 2006. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International* 39: 791–800.

Pérez-Lopez P, González-García S, Allewaert C, Verween A, Murray P, Feijoo G, Moreira MT. 2014. Environmental evaluation of eicosapentaenoic acid

production by *Phaeodactylum tricornutum*. *Science of the Total Environment* 466: 991-1002.

Pisoshi AM, Cheregi MC, Danet AF. 2009. Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches. *Molecules* 14: 480-493.

Popkin BM, Armstrong LE, Bray GM, Caballero B, Frei B. y Willett WC. 2006. A new proposed guidance system for beverage consumption in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition* 83:529-542.

Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B. 2005. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3273-79.

Priyadarshani I, and Rath B. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae – a review. *Journal Algal Biomass* 3: 89-100.

Pulz O. 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology* 57:287–293.

Pulz, Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae.

Applied Microbiology Biotechnology 65: 635–648.

Ramos-Suarez JL, Carreras N. 2014. Use of microalgae residues for biogas production. *Chemical Engineering Journal* 242: 86–95.

Ramírez A, y Pacheco E. 2009. Propiedades funcionales de harinas altas en fibra dietética obtenida de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia* 34:293-298.

Ramus J.1981. The capture and transduction of light energy. En: C.S. Lobban & M.J. Wynne Eds. the biology of the seaweeds. Boston: Blackwell Scientific Publications p.458–492.

Raposo MF, De Morais-Costa RMS, De Morais-Bernardo AMM. 2013. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. Life Science 93: 479-486.

Rawat I, Ranjith K, Mutanda T, Bux F. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. Applied Energy. 88: 3411-24.

Rawat I, Ranjith K, Mutanda T. 2013. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. Applied Energy 103: 444-467.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Panala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26: 1231-1237.

Renault F, Sancey B, Badot PM, Crini G, 2009. Chitosan for coagulation/flocculation processes – an eco-friendly approach. European Polymer. J. 45, 1337–1348.

Renaud SM, Thinh LV, Lambrinidis G, Parry DL. 2002. Effect of temperature on

growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. Aquaculture 211: 195-214.

Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J, Valdez-Ortiz A, Delgado-Vargas F, Sánchez-Magaña LM, Rochín-Medina JJ, Gutiérrez-Dorado R. 2014. Bebida con

potencial nutracéutico elaborada con maíz QPM extrudido y frijol fermentado. Revista Iberoamericana de Ciencias 1: 61-77.

Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J, Gutiérrez-Dorado R, Paredes-López O, Cuevas-Rodríguez EO, Garzón-Tiznado JA. 2003. Instant flour from quality protein maize (*Zea mays* L). Optimization of the extrusion process. Lebens. Wiss. U-Technology. 36: 685-695.

Richardson A, Fedoroff S. 2001. Quantification of cells in culture. En: Protocols for Neural Cell Culture. Fedoroff S, Richardson A. Eds. Humana press Inc., 3 Ed.

Totowa, NJ p 333-339.

Rivera JA, Muñoz-Hernández O, Rosas-Peralta M, Aguilar-Salinas CA, Popkin BM, Willett WC. 2008. Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. Salud Pública Mexicana 50:173-195.

Rizi J. 2010. Potencial biotecnológico de polisacáridos de microalgas marinas. [Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Bioquímicas]. Universidad Federal do Parana 102 p.

Rohín-Medina J. 2014. Bebidas y alimentos funcionales de valor nutricional/nutracéutico alto a partir de bioprocesamiento de granos integrales. Optimización por actividad antioxidante. [Tesis de Doctorado]. Sinaloa, México: Universidad Autónoma de Sinaloa 258 p.

Rochín-Medina J, Milán-Carrillo R, Gutiérrez-Dorado R, Cuevas-Rodríguez EO, Valdez-Ortiz A, Mora-Rochín S, Delgado-Vargas F, Reyes-Moreno C. 2015. Bebida funcional de valor nutricional / nutracéutico alto elaborada a partir de una

mezcla de granos integrales (maíz + garbanzo) extrudidos. Revista Iberoamericana de Ciencias 2: 51-65.

Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnology and Bioengineering. 102: 100-112.

Rodríguez-García I, Guil-Guerrero JL. 2008. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. Food Chemistry 108:1023–1026.

Rodriguez EM, Steffolani ME, Martínez C, León AE. 2014. Effects of spirulina biomas on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. Food Science and Technology 58: 102-108.

Rodríguez-Meizoso I, Jaime L, Santoyo S, Señorán FJ, Cifuentes A, Ibáñez E. 2010. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. Journal Pharmacy Biomedical Analysis 51:456–463.

Romero TL, Ferrán CG. 2001. Flocculación de *Chrorella sp.* con la utilización de quitosana. Revista de Investigación Marina 22: 57-62.

Roseberg JN, Oylerl GA, Wilkinson L, Betenbaugh MJ. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. Current Opinion in Biotechnology 19: 430-436.

Ryckebosch E, Bruneel C, Termote-Verhalle, R, Goiris K, Muylaert K, Imogen F. 2014, Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain

polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food Chemistry* 160: 393–400.

Sánchez-Mirón A, Cerón García MC, Gómez AC, Camacho FG, Grima EM, Chisti Y. 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 16: 287–297.

Salazar-Pérez LE. 2012. Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. [Tesis Licenciatura en Ingeniería]. Universidad de Piura 145 p.

Salim S, Bosma R, Vermüe MH, Wijffels R. 2011. Harvesting of microalgae by bio-flocculation, *Journal Applied Phycology* 23: 849-855.

Samarakoon KW, Jeon YJ. 2012. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae-A review. *Food Research International* 48: 948-960.

Sanchez MA, Ceron MC, Contreras A, Garcias CF, Molina E, Chisti Y. 2003. Shear tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering* 16:287-97.

Sánchez-Perales JX, Reyes-Moreno C, Gómez-Favela MA, Milán-Carrillo J, Cuevas-Rodríguez E, Valdez-Ortiz A, Gutiérrez-Dorado R. 2014. Increasing the antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents by optimizing the germination conditions of amaranth seeds. *Plant Foods Human Nutrition* 69: 196-202.

Santos-Ballardo DU, Font-Segura X, Ferrer SA, Barrena R, Rossi S, Valdez-Ortiz A. 2015a. Valorization of biodiesel production wastes: Anaerobic digestion of

residual *Tetraselmis suecica* biomass and co-digestion with glycerol. *Waste Management & Research* 33: 250-257.

Santos-Ballardo DU, Rossi S, Hernández V, Vázquez Gómez R, Rendón-Unceta MC, Caro-Corrales J, Valdez-Ortiz A. 2015b. A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. Aquaculture ID: AQUA-S-14-02133.

Satyanarayana KG, Mariano AB, Vargas JVC. 2011. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal Energy Resource* 35:291–311.

Scott SA, Davey MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ, Smith AG. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*. 21: 277-286.

Sepúlveda DR. 2013. Tendencias en bebidas lácteas funcionales. *Food News LatAm: Portal de Noticias Agroalimenticias y Nutrición* dirigidas a profesionales de América Latina Disponible de: www.foodnewslatam.com. Consultado el 17 de Septiembre de 2015.

Shahidi F y Weerasinghe DK. 2004. *Nutraceutical beverages*. American Chemical Society Publication. 1° ed. Washington, DC, EUA p 131-147.

Shukla M, Dhar DW. 2013. Biotechnological Potentials of Microalgae: Past and Present Scenario. *Society Plant Research* 26:229-37.

Sialve B, Bernet N, Bernard O. 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*. 27: 409-416.

Sierra E, Acien F G, Fernandez JM, Garcia JL, Gonzalez C, Molina Grima E. 2008. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Journal Chemical Engineering* 128: 138-147.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.

Sirin S, Trobajo R, Ibanez C, Salvadó J. 2012. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. *Journal Applied Phycology* 24: 1067-1080.

Soto-León S, Zazueta-Patrón IE, Piña-Valdez P, Nieves-Soto M, Reyes-Moreno C, Contreras-Andrade I. 2014. Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: proceso asistido por ultrasonido y solvents. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13: 723.737.

Sydney EB, Sturm W, De Carvalho JC, Thomaz-Soccol V, Larroche C, Pandey A, Soccol CR. 2010. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology*. 101: 5892-5896.

Takebayashi J, Oki T, Watanabe J, Yamasaki K, Chen J, Sato-Furukawa M, Tsubota-Utsugi M, Taku K, Goto K, Matsumoto T, Ishimi Y. 2013. Hydrophilic antioxidant capacities of vegetables and fruits commonly consumed in Japan and estimated average daily intake of hydrophilic antioxidants from these foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 29: 25-31.

Tibbetts SM, Whitney GC, MacPherson MJ, Bhatti S, Banskota AH, Stefanova R, McGinn PJ. 2014. Biochemical characterization of microalgal biomass from

freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal applications. Algal Research. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.11.011>.

Tibbetts SM, Bjornsson WJ, McGinn PJ. 2015a. Biochemical composition and amino acid profiles of *Nannochloropsis granulate* algal biomass before and after supercritical fluid CO₂ extraction at two processing temperatures. Animal Feed Science and Technology 204: 62-71.

Tibbetts SM, Milley JE, Lall SP. 2015b. Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. Journal Applied Phycology 27: 1109-1119.

Toro C, Reddy MM, Navia R, Rivas M, Misra M, Mohanty AK. 2013. Characterization and application in biocomposites of residual microalgal biomass generated in third generation biodiesel. Journal Polymer Environmental. 21:944-951.

Tuan ZH, Yussoff FM, Mohamed MS, Shariff M, Din M, Ariff AB. 2009. Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. African Journal of Biotechnology 8: 5971-5978.

Ulloa G, Otero A, Sánchez M, Sineiro J, Núñez, MJ, Fábregas J. 2011. Effect of Mg, Si, and Sr on growth and antioxidant activity of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. Journal Applied Phycology 24: 1229-1236.

USDA [U.S. Department of Agriculture] 2005. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol Protein, aminoacids. Institute of medicine of the National Academies. National Academies Press. Washington, DC, EUA p 1330.

USDA [U.S. Department of Agriculture] 2010. Antioxidants and Health. ACES publications.4 p.

Vandamme D, Foubert I, Meesschaert B, Muylaert K. 2010. Flocculation of microalgae using cationic starch. *Journal Applied Phycology* 22:525–530

Van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM. 1995. Algae. An Introduction to Phycology. En: *Algae. An Introduction to Phycology*. Eds Van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM. Cambridge University Press. New York p 125-134.

Vásquez-Suárez A, Guevara M, Salazar G, Arredondo-Vega B, Cipriana R, Lemus N, Lodeiros C. 2007. Crecimiento y composición bioquímica de cuatro cepas de *Dunaliella* para ser utilizadas en acuicultura. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* 41: 181-194.

Visser A, y Thomas A. 1987. Reviews soya protein products: Their processing functionality and application aspect. *Food Reviews International* 3: 1-32.

Wang B, Li Y, Wu N, Lan C. 2008. CO₂ Bio-mitigation using microalgae. *Applied microbiology and Biotechnology*. 79: 707-718.

Williams PJ, Laurens LM. 2010. Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: Review and analysis of the biochemistry, energetics and economics. *Energy and Environmental Science*. 3: 554-590.

Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Food Chemistry* 52:4026-37.

Xi W, Zhang Y, Sun Y, Yan S, Ye X, Zhou Z. 2014. Phenolic composition of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Balnco.) pulps and their antioxidant properties. *Industrial Crops and Products* 52:466-474.

Xia S, Wang K, Wan L, Li A, Hu Q, Zhang C. 2013. Production, Characterization, and Antioxidant Activity of Fucoxanthin from the Marine Diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs* 11: 2667-2681.

Xu B, Chang S. 2007. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvent. *Journal of Science* 72:159-166.

Yoshida, K, Ishii, H, Ishihara, Y, Saito, H, Yoshishiro, O. 2009. Bioremediation potencial of formaldehyde by marine microalga *Nannochloopsis oculata* ST-3 strain. *Appl. Biochemistry Biotechnology* 15: 321-328.

Yu L, Chen L, 2009. Polymeric materials from renewable resources. In: Yu, L. Eds *Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resources*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470391501>.

Zapata K, Cortes F, Rojano BA. 2013. Polyfenols and antioxidant activity of sour guava fruit (*Psidium araca*). *Information Technological* 24: 103-112.

Zamalloa C, Vulsteke W, Albretch J, Verstrate W. 2011. The technoeconomic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. *Bioresource Technology* 102: 1149-1158.

Zhao B, Ma J, Zhao Q, Laurens L, Jarvis E, Chen S, Frear C. 2014. Efficient anaerobic digestion of whole microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production. *Bioresource Technology* 161: 423–430.

Zhao P, Gu W, Wu S, Huang S, He L, Xie X, Gao S, Zhang B, Niu J, Lin AP, Wang G. 2013. *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin under green light and low temperature. *Scientific Reports* 4: 39-58.

ABREVIATURAS

A	Aceptabilidad
<u>a</u>	Parámetro Hunter-Lab
AAE	Aminoácidos esenciales
ADA	American Diabetes Association
AAE	Aminoácidos no esenciales
Ac	Ácido

Ala	Alanina
AOAC	Association of Oficial Analytical Chemists
Arg	Arginina
Aw	Actividad de agua
<u>b</u>	Parámetro Hunter-Lab
bs	Base seca
CAox	Capacidad Antioxidante
Ca	Calcio
cal	Caloría
cel	Células
cm	Centímetro
col	Colaboradores
CBR	Concentración de biomasa residual
CFT	Compuestos fenólicos totales
CS	Concentración de saborizante
Cu	Cobre
°C	Grados centígrados
DO	Densidad óptica
<i>dt</i>	Tiempo de duplicación
Ed	Editores
ET	Equivalentes de Trolox
EAG	Equivalentes de ácido Gálico
FAO	Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas

Fig	Figura
FO	Formulación optimizada
g	Gramos
h	Hora (s)
Ile	Isoluecina
K	Potasio
Kcal	Kilocaloría (s)
Kg	Kilogramo
L	Litro
<u>L</u>	Parámetro Hunter-Lab
LAM	Escala Labeled Affective Magnitude
Leu	Leucina
Lys	Lisina
m	Metro
M	Molar
Mb	Molibdeno
Mg	Magnesio
mg	Mili gramo
Mm	Mili molar
Mn	Manganeso
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
μ M	Micro molar

μg	Micro gramo
ND	No determinado
NP	No presente
N°	Numero
NaCl	Cloruro de sodio
P	Fosforo
p	Nivel de significancia
Pág	Página
pH	Potencial hidrógeno
p/v	Relación peso-volumen
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
TR	Tiempo de retención
t	Tiempo
USDA	U.S. Department of Agriculture
Val	Valina
v/v	Relación volumen-volumen
WHO	Organización Mundial para la Salud
ΔE	Diferencia total de color
Zn	Zinc
μ	Tasa de crecimiento específico