



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

**FORMULACIÓN DE UNA BEBIDA FUNCIONAL A BASE DE
BIOMASA RESIDUAL DE LA MICROALGA *Dunaliella*
*tertiolecta***

TESIS

Que presenta

IBQ ANA LUISA FÉLIX SÁMANO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIA

Y

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

DR. ANGEL VALDEZ ORTIZ

DR. ROBERTO GUTIÉRREZ DORADO

Culiacán, Sinaloa, México

Septiembre 2016

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos y en el Laboratorio de Bioprocesos y Alimentos Funcionales, ambos de la Facultad de Ciencias Químico-biológicas en la Universidad Autónoma de Sinaloa. La investigación fue dirigida por los doctores Angel Valdez Ortiz y Roberto Gutiérrez Dorado y asesorada por los Dr. Lourdes Germán Báez, Cuauhtémoc Reyes Moreno y David Santos Ballardó. Esta investigación contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Asimismo, se agradece la beca otorgada por CONACYT a Ana Luisa Félix Sámano.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán de Rosales, Sinaloa el día 29 del mes septiembre del año 2016, el (la) que suscribe I.B.Q. Ana Luisa Félix Sámano alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 1375603-6, de la Unidad Académica Facultad de Ciencia Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Ángel Valdéz Ortiz y Dr. Roberto Gutiérrez Dorado y cede los derechos del trabajo titulado "Formulación de una bebida funcional a base de biomasa residual de la microalga *Dunaiella Tertiolecta*", 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.

Ana Luisa

I.B.Q. Ana Luisa Félix Sámano

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación es en gran medida el resultado en conjunto de múltiples apoyos que han sido de gran importancia en mi vida, aquellas personas que ya sea desde leer, corregir, hasta el simple hecho de tenerme paciencia, dar ánimo, o sencillamente acompañarme en los momentos de crisis y bloqueos, al igual que en los momentos de alegrías. De los que me han acompañado en este esfuerzo, muchos han estado desde antes de iniciarlo, otros fueron fundamentales para la decisión de emprenderlo y otros han ido apareciendo a lo largo del camino. Algunos han pasado y otros han llegado para quedarse, con todos he aprendido y enriquecido en experiencia y conocimiento.

Un agradecimiento a todos los laboratorio de la Maestría, a sus titulares Dr. José Ángel, Dr. Misael, Dr. Ernesto, Dr. Caro, Dr. Milán, Dra. Edith, Dra. Saraid, Dra. Lili, Dr. Angel Valdez así como sus integrantes, por toda sus disponibilidad, apoyo, por esperarme en algunas situaciones, por permitirme usar las instalaciones y equipos, muchísimas gracias.

A la generación del programa de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos (2013-2015) por todo su apoyo en la realización del trabajo de investigación, ya que sin su ayuda no hubiese podido lograrlo.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas por el Dr. Roberto Gutiérrez Dorado, con el que me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada. Además un gigante agradecimiento al Laboratorio de Bioprocesos y alimentos funcionales, y a todos los integrantes ya que

sin su apoyo, asesoramiento, regaños no hubiera podido llevar a cabo el trabajo experimental. Otra persona que le agradezco muchísimo es a la Dra. Xiomara Perales gracias a ella aprendí muchas de las técnicas que requería para mi trabajo de investigación, además por su paciencia, su disposición y compañía.

Un agradecimiento mas a los chicos de servicio social, mil gracias por alegrar el día con su nobleza, sinceridad y energía, los recuerdo con mucho cariño.

A mis amigos Rosalio, Mariela, Jennifer, Mariana por todo su apoyo brindado, sin su ayuda y apoyo en todo momento, en darme ánimos y llenarme de fuerza, no hubiese podido lograr chicos, saben que los aprecio mucho, y tendremos muchos momentos juntos son los mejores.

En especial quiero agradecer y dedicar este trabajo a Jesús Espinoza, que me ha acompañado y aguantado todo mi mal humor, mis indecisiones, mis altibajos. Sin su amor y su apoyo, esto no hubiera sido posible. Gracias por no desesperarte y darme fuerzas cuando me faltaban.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo incondicional que me otorgaron y el cariño que me inspiraron mis padres, que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos. Gracias por todo lo que me han enseñado y los valores que me han inculcado.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
I RESUMEN	11
ABSTRACT	13
II INTRODUCCIÓN	15
III REVISIÓN DE LA LITERATURA	17
A MICROALGAS	17
1 Generalidades	17
2 Clasificación de las microalgas	18
a <i>Dunaliella tertiolecta</i>	19
3 Composición bioquímica de microalgas	26
4 Cultivo de microalgas	29
5 Cosecha de microalgas	36
6 Usos de la biomasa microalgal	38
7 Biomasa residual (BR)	43
a Composición química	44
b Usos	50
B ALIMENTOS FUNCIONALES	52
1 Generalidades	52
2 Propiedades nutracéuticas en los alimentos	58
a Contenido de fenólicos	60
b Capacidad Antioxidante	62

3	Clasificación de los alimentos funcionales	66
C	BEBIDAS	70
1	Generalidades	70
2	Consumo	71
3	Bebidas funcionales	75
IV	JUSTIFICACIÓN	78
V	HIPÓTESIS	79
VI	OBJETIVOS	80
A	OBJETIVO GENERAL	80
B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	80
VII	MATERIALES Y MÉTODOS	81
A	MATERIALES	81
1	Material biológico	81
B	MÉTODOS	81
1	Cultivo de microalgas	81
a	Barrido de absorbancia máxima	83
2	Cinética de crecimiento	83
3	Obtención de la biomasa microalgal	86
a	Floculación	86
1)	Evaluación de la eficiencia de floculación	86
b	Proceso de extracción de aceite	88
4	Composición química, propiedades fisicoquímicas y nutraceuticas de la BR	89

a	Composición química	89
	1) Humedad	89
	2) Proteína cruda	89
	3) Lípidos	90
	4) Fibra dietaría total	90
	a) Insoluble	90
	b) Soluble	91
	5) Cenizas	91
	6) Carbohidratos	91
b	Propiedades fisicoquímicas	92
	1) pH	92
	2) Color	92
	3) Actividad de agua (a_w)	93
	4) Índices de solubilidad y absorción de agua (ISA, IAA)	93
	5) Índice de dispersabilidad	93
c	Propiedades nutraceuticas	94
	1) Obtención de los extractos fitoquímicos libres	94
	a) Extractos etanólicos y metanólicos	94
	2) Obtención de los extractos fitoquímicos ligados	94
	a) Extractos etanólicos y metanólicos	94
	3) Determinación del contenido de fitoquímicos	96
	a) Compuestos fenólicos totales	96
	4) Determinación de la capacidad antioxidante	97

a)	Método ORAC	97
b)	Método ABTS	98
c)	Método DPPH	99
5	Optimización de formulación para la preparación de una bebida funcional con capacidad antioxidante alta	99
a	Diseño experimental	99
b	Obtención de las formulaciones de mezclas de BR y saborizante empleadas para elaborar las bebidas funcionales	100
c	Capacidad antioxidante de las formulaciones	100
1)	Obtención de los extractos de fitoquímicos libres	100
2)	Obtención de los extractos de fitoquímicos ligados	100
3)	Determinación de la capacidad antioxidante (Caox) por ABTS	101
d	Análisis de varianza y regresión	101
e	Optimización	103
6	Caracterización nutricional y nutracéutica de la formulación optimizada	103
a	Composición química	103
b	Contenido energético	103
c	Propiedades nutracéuticas	103
1)	Capacidad antioxidante	103
a)	Obtención de los extractos fitoquímicos libres	103
b)	Obtención de los extractos fitoquímicos ligados	103

c)	Determinación de la capacidad antioxidante por métodos ORAC, ABTS y DPPH	103
2)	Contenido de compuestos fenólicos totales	103
7	Análisis estadístico	103
VIII	RESULTADOS Y DISCUSIONES	105
A	CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA MICROALGA	105
B	OBTENCIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL	108
1	Tratamiento de floculación	108
C	COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA BIOMASA RESIDUAL	111
1	Composición química	111
2	Propiedades fisicoquímicas	113
D	CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA BIOMASA RESIDUAL	115
E	FORMULACIÓN ÓPTIMA A BASE DE BIOMASA RESIDUAL Y SABORIZANTE PARA LA PREPARACIÓN DE UNA BEBIDA FUNCIONAL CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ALTA	122
1	Modelos experimentales de predicción	122
a	Capacidad antioxidante (Caox)	122
2	Optimización	127
F	COMPOSICIÓN QUÍMICA, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES DE LA FORMULACIÓN OPTIMIZADA PARA LA ELABORACIÓN DE UNA	127

BEBIDA FUNCIONAL	
G	CONTENIDO NUTRIMENTAL Y ENERGÉTICO, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA BEBIDA FUNCIONAL PREPARADA A PARTIR DE LA FORMULACIÓN OPTIMIZADA A BASE DE BIOMASA RESIDUAL Y SABORIZANTE 133
IX	CONCLUSIONES 141
X	BIBLIOGRAFÍA 142
	abreviaturas 173

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig	Descripción	Pág.
1	Diferentes especies de microalgas del género <i>Dunaliella</i>	23
2	Pigmentos de importancia en microalgas	30
3	Tipos de reactores para el cultivo masivo de microalgas	32
4	Diferentes condiciones para el cultivo de microalgas	35
5	Aplicaciones generales para el uso de la biomasa de microalgas	40
6	Proceso de transformación energética a partir de microalgas	45
7	Principales países en el mercado mundial de los alimentos funcionales	56
8	Desarrollo de la industria nutracéutica a través de los años	59
9	Diagrama general de producción de la microalga	82
10	Calculo del número celular utilizando el hemocitómetro	85
11	Proceso de floculación para la obtención de la biomasa de la microalga <i>D. tertiolecta</i>	87
12	Diagrama de flujo para la obtención de fitoquímicos libres y ligados, metanólicos y etanólicos para la determinación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales	95
13	“Caja negra” del modelo matemático que muestra la relación entre las variables de proceso y variable de respuesta de las formulaciones para la elaboración de bebidas funcionales a partir de biomasa residual y saborizante	102
14	Cinética de crecimiento de <i>D. tertiolecta</i>	106
15	Gráficas de superficie de respuesta (A) y contornos (B) mostrando el efecto de las variables independientes [CBR: concentración de biomasa residual (g), CS: concentración de saborizante (g)] sobre la capacidad antioxidante [C _{aox} (μmoles ET/300 mL)] de bebidas nutracéuticas elaboradas con formulaciones a base de biomasa residual y saborizante	126

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Clases de microalgas de mayor importancia actualmente en la industria	20
2	Composición general de diferentes microalgas y comparación de valores de fuentes tradicionales de alimento	27
3	Aplicaciones en la salud de compuestos bioactivos presentes en la biomasa de las microalgas	41
4	Composición bioquímica de la biomasa residual de diferentes microalgas	47
5	Perfil de aminoácidos presentes en la biomasa residual de microalgas	49
6	Compuestos identificados a través de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) en biomasa residual de <i>D. tertiolecta</i>	51
7	Alimentos funcionales actualmente en el mercado de Estados Unidos	57
8	Compuestos fenólicos extraídos de la biomasa de microalgas	63
9	Compuestos antioxidantes encontrados en microalgas	67
10	Principales tipos de alimentos funcionales disponibles en el mercado	69
11	Clasificación de los diferentes sistemas de bebidas	72
12	Microalgas usadas como ingrediente en la elaboración de bebidas del tipo funcional	77
13	Resultados experimentales de eficiencia de recuperación de biomasa microalgal de la especie <i>D. tertiolecta</i>	109
14	Composición química y propiedades fisicoquímicas de la biomasa residual de la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i>	112
15	Capacidad antioxidante hidrofílica y contenido de fenólicos totales de la biomasa residual de la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i>	116

16	Diseño experimental ¹ empleado para obtener diferentes combinaciones (formulaciones) de concentración de biomasa residual y saborizante (CBR y CS), para la preparación de bebidas funcionales a base de biomasa residual de la microalga <i>D. tertiolecta</i> , y resultados experimentales de la variable de respuesta (Caox)	123
17	Coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos experimentales de predicción mostrando la relación entre la variable de respuesta (Caox) y variables del proceso (CBR, CS) para la elaboración de una bebida funcional a partir de biomasa residual de <i>D. tertiolecta</i>	124
18	Contenido nutrimental, capacidad antioxidante y contenido de fenólicos totales de la formulación optimizada (FO) preparada a base de biomasa residual de microalga y saboriznte, adecuada para elaborar una bebida funcional con capacidad antioxidante alta	129
19	Contenido nutrimental, capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos para una porción de 300 mL, de una bebida nutracéutica preparada con la formulación optimizada a base de biomasa residual de la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> y edulcorante	136

I RESUMEN

En la actualidad, la humanidad enfrenta una serie de retos en términos de fuentes de energía renovables; por esta razón, existe una tendencia internacional hacia la búsqueda de nuevas fuentes de energía renovables de baja emisión de carbono. Dentro de las fuentes energéticas renovables disponibles hoy en día, las microalgas han despertado un gran interés durante los últimos años; sin embargo, aún no se logran producir a costos competitivos, por ello algunos autores proponen la utilización de la microalga completa a través de un enfoque de biorrefinería con el objetivo de reducir los costos de procesamiento, lo cuál podría ser una estrategia para aumentar la viabilidad de la industria de microalgas. Una alternativa es la utilización de la biomasa residual, obtenida como producto de desecho después de la extracción de aceite en la producción de biodiesel. Esta propuesta se basa en que se ha encontrado que las microalgas además de ser una potencial fuente de bioenergía pueden sintetizar un gran número de moléculas con actividad biológica como lo son aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas, minerales, pigmentos, entre otros. Por ello, algunas microalgas han sido cultivadas de manera comercial tales como: *Spirulina*, *Chlorella*, *Haematococcus*, *Botryococcus*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium* y *Dunaliella*. Esta última ha generado gran interés, debido a su excepcional habilidad para proliferar en ambientes con grandes intervalos de salinidad y temperatura; destaca también, que al crecer bajo condiciones de estrés puede acumular grandes cantidades de ácidos grasos. El potencial de las microalgas para el desarrollo de productos de alto valor ha sido ampliamente reconocido; sin embargo, el éxito comercial sólo se ha dado para algunas especies, lo que abre

la oportunidad a un amplio nicho de mercado, ya que tanto la biomasa de microalgas completa, como la residual, presentan un gran potencial para ser empleadas en la elaboración de productos farmacéuticos, como energéticos, biotecnología, cosméticos, como suplemento alimenticio e ingrediente funcional. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una bebida funcional con buenas propiedades nutrimentales y nutracéuticas, a partir de la biomasa residual de la microalga *Dunaliella tertiolecta*. Para obtener la formulación óptima a base de biomasa residual y saborizante para producir una bebida funcional con capacidad antioxidante alta, se utilizó la metodología de superficie de respuesta, tomando como factores la concentración de biomasa residual y saborizante (CBR y CS, respectivamente), la variable de respuesta fue capacidad antioxidante de las bebidas nutracéuticas. Para obtener la formulación optimizada se buscó maximizar la Ca_{ox}, utilizando CBR y CS dentro del rango del diseño experimental. La formulación optimizada (**FO**) fue CBR 9.0 g y CS 3.0 g por cada 300 mL de bebida funcional. Una porción de 300 mL de bebida nutracéutica preparada a partir FO aporta el 22.9% y 15.7% del requerimiento diario de proteína para niños y niñas de 1-3 y 4-8 años, respectivamente. Esta bebida funcional puede ser usada como una alternativa a bebidas con valor nutricional/nutracéutico bajo tales como las preparadas con agua, azúcares simples, saborizantes y colorantes artificiales, las cuales son ofrecidas ampliamente en el mercado.

ABSTRACT

Nowadays, humanity faces a number of challenges in terms of renewable energy sources, which is why there is an international trend towards finding new sources of renewable low-emission energy carbon. In the renewable energy sources available today, the microalgae show a great interest in recent years, however could not be produce to competitive cost, for this reason some authors propose the use of the complete microalgae through a biorefinery approach in order to reduce processing costs, which could be a strategy to increase the viability of microalgae industry. An alternative is the use of the residual biomass, obtained as a waste product after oil extraction in the production of biodiesel. This proposal is based on that microalgae has been a potential source of bioenergy also can synthesize a large number of biologically active molecules such as amino acids, fatty acids, carbohydrates, vitamins, minerals, pigments, among others. Therefore, some microalgae have been grown commercially such as *Spirulina*, *Chlorella*, *Haematococcus*, *Botrycoccus*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium* and *Dunaliella*. The last one has generated great interest due to their exceptional ability to proliferate in environments with high salinity and temperature ranges; also stresses that grow under stress can accumulate large amounts of fatty acids. The potential of microalgae for the development of high value products has been widely recognized; but commercial success has only been given for some species; this issue opens the opportunity for a broad niche, as both complete and residual biomass of microalgae have great potential for use in the manufacture of pharmaceuticals, cosmetics, dietary supplement and functional ingredient. Due to it, the objective of this work was develop a functional beverage with good

nutritional and nutraceutical properties, from the residual biomass of microalgae *Dunaliella tertiolecta*. For optimize the formulation based on residual biomass and flavoring to produce a functional beverage with high antioxidant capacity, the response surface methodology was used, taking as factors the concentration of residual biomass and flavoring (CRB and CF, respectively); the response variables was antioxidant capacity of nutraceutical beverage. For optimize the formulation of the functional beverage, Caox responses was maximized, and CRB and CF were maintained within the range of the experimental design. The optimized formulation was CBR 3.0 g and CS 9.0 g per 300 mL of beverage. A serving of 300 mL of nutraceutical beverage prepared from FO contributes 22.9% and 15.7% of the daily requirement of protein for children of 1-3 and 4-8 years old, respectively. This functional beverage can be use as an alternative to beverages with nutritional /nutraceutical low value such as those prepared with water, simple sugars, flavoring and coloring artificial, which are widely available on the market.

II INTRODUCCIÓN

En los últimos 50 años, la población mundial aumentó más del doble. Este hecho, junto a una extensión de la esperanza de vida, han dado lugar a un aumento dramático en el consumo de energía primaria, principalmente a partir de fuentes fósiles (Jones y Mayfield, 2012). A causa de esta situación, existe una tendencia internacional hacia la búsqueda de combustibles más seguros y nuevas fuentes de energía de baja emisión de carbono, como la energía solar, térmica, fotovoltaica, hidroeléctrica, geotérmica, eólica, aquella proveniente de los biocombustibles, entre otras. La mayoría de éstas, están siendo evaluadas para conocer las ventajas y desventajas que representa su empleo en comparación con las fuentes de energía no renovables (Posten y Schaub, 2009; Larkum y col, 2011). La utilización de tecnologías de producción de microalgas ha surgido como una opción promisoría en la producción de bioenergía con el fin de mejorar la seguridad de los combustibles, ya que presentan menor grado de toxicidad (Fernández-Linares y col, 2012), siendo capaces de proveer alrededor del 25% de la energía global requerida en comparación con los combustibles fósiles; además, su empleo posee un gran número de ventajas tales como un crecimiento continuo en agua a un amplio rango de salinidad y nutrientes, así como la capacidad de crecimiento tanto en tierra cultivable como en no cultivable, sin la necesidad de utilizar herbicidas o pesticidas (Barros y col, 2015; Santos-Ballardo y col, 2015b). Es por ello que se ha considerado como una fuente de combustible renovable, con capacidad de ser empleados para la producción de biodiesel, biometano, bioetanol y biohidrógeno. A estos productos energéticos se le ha denominado biocombustibles de tercera generación, de los

cuales, el que mayor interés ha despertado es el obtenido por la transesterificación de los lípidos presentes en las microalgas (Santos-Ballardo y col, 2015b).

No obstante lo anterior, para desarrollar biocombustibles a partir de microalgas a través de procesos económicamente viables, es necesario utilizar de manera integral la mayoría de los componentes existentes en el cultivo lo que es posible partiendo del concepto de biorrefinería (Kim y col, 2015b). Durante el proceso de obtención de biodiesel se obtiene un producto de desecho denominado biomasa residual, que es rica en proteínas y carbohidratos, por lo que podría ser potencialmente explotada como ingrediente en alimentos o en la producción de biocombustibles (principalmente de tipo biogás); además, de dicha biomasa podrían obtenerse productos de alto valor en el mercado; sin embargo actualmente no es utilizada para otro fin (Tibbetts y col, 2015b).

El objetivo de este trabajo fue aprovechar la biomasa residual para contribuir al aprovechamiento integral de un cultivo de microalga, y una forma de utilizarla, es mediante el desarrollo de una bebida funcional con buenas propiedades nutrimentales y nutracéuticas, a partir de la biomasa residual de la microalga *Dunaliella tertiolecta*.

III REVISIÓN DE LA LITERATURA

A MICROALGAS

1 Generalidades

Las microalgas son organismos autótrofos o heterótrofos, que constituyen alrededor de 50,000 especies, presentan una enorme variación genética y diversidad química, son organismos microscópicos que miden alrededor de 1-200 μm (Larkum y col, 2011). Estas presentan forma unicelular y son consideradas uno de los organismos vivientes más antiguos (1.5-2 billones de años) (El-Baky y col, 2008). A estos microorganismos se les ha considerado pertenecientes a un grupo polifilético ya que son descendientes de más de un ancestro en común y no pueden ser consideradas en un solo tipo de organización celular (Wang y col, 2008). Algunos autores han concluido que las microalgas se pueden localizar taxonómicamente en la base de la organización eucariótica en el reino de los protistas (Larkum y col, 2011).

Existen dos tipos básicos de células en las microalgas, procariota y eucariota. Las células procariotas carecen de organelos delimitados por membrana tales como plástidos, mitocondria, núcleo, aparato de Golgi y flagelos, a este grupo pertenecen las cianobacterias. El resto de las microalgas son eucariotas y presentan organelos tales como cloroplastos, vacuola, retículo endoplásmico, flagelos, aparato de Golgi, mitocondria, núcleo y pared celular (Lee, 2008). Estos microorganismos fotosintéticos son la base de la cadena alimentaria en los sistemas acuáticos, formando el fitoplancton (Satyanarayana y col, 2011), por lo tanto, son responsables de más del 50% de la productividad

fotosintética primaria en la tierra, representando fábricas solares para un amplio rango de productos potencialmente benéficos (Milledge 2011). Las microalgas se encuentran en todo el mundo, se distribuyen principalmente en el ambiente acuático, pero también se encuentran en la superficie de todo tipo de suelos. Aunque por lo general son de vida libre, un cierto número de microalgas viven en asociación simbiótica con una variedad de otros organismos (Richmond, 2004).

La diferencia de las microalgas con respecto a las plantas superiores es debido a que estas no presentan tejidos definidos como el tallo y las raíces, por lo que se les ha denominado talófitas (Lee, 2008; Dragone y col, 2010), además, carecen de lignina en sus estructuras de celulosa, lo anterior podría ser, que al crecer en ambientes acuáticos, no requieren de un gran soporte (Rojan y col, 2011). Aunque el mecanismo de fotosíntesis de estos microorganismos es similar al de las plantas superiores, generalmente son más eficientes para convertir la energía solar, esto debido a que presentan una estructura celular simple. Las microalgas absorben más CO_2 y liberan más O_2 que cualquier planta (por cada 100 ton de microalgas producidas, se consumen 183 ton de CO_2), crecen extremadamente rápido y llegan a acumular grandes cantidades de diversos productos (Chisti, 2007).

2 Clasificación de las microalgas

La forma más común de clasificar las microalgas ha sido acorde a su coloración (tipo de pigmento acumulado), esta característica sigue siendo la de mayor importancia actualmente. Sin embargo, otros sistemas de clasificación de microalgas se basan en criterios tales como: naturaleza química de los productos de almacenamiento ó los componentes de la pared celular (Lee, 2008).

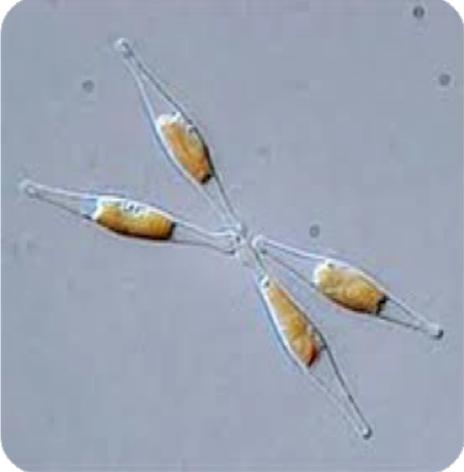
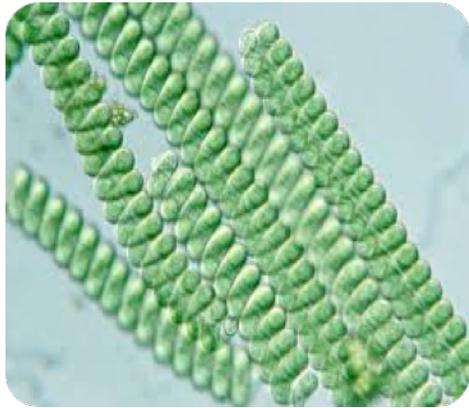
Existe un gran número de especies de microalgas, los cuales difieren en la composición del pigmento primario, constituyentes bioquímicos, ultraestructura y ciclo de vida. Basándose en el tipo de pigmento primario, se pueden clasificar en tres grupos: microalgas cafés (*Phaeophyceae*), microalgas rojas (*Rhodophyta*), y microalgas verdes (*Chlorophyta*). Además de estos grupos existen otros grupos específicos de organismos unicelulares como microalgas verde-azules (*Cyanophyceae*), diatomeas (*Bacillariophyta*), y dinoflagelados (*Dinophyceae*); estas especies, son comúnmente conocidas como fitoplancton (Garson, 1993; Samarakoon y Jeon, 2012). Las clases de microalgas de importancia en la actualidad se muestran en el **Cuadro 1**.

Ciertas microalgas del género *Chlorophyta* como *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella* son cultivadas comercialmente para fines nutracéuticos y otros productos algales (Acacio-Chirino y col, 2013). De éstas, *Dunaliella* ha llamado la atención durante los últimos años debido a su habilidad para proliferar en ambientes con un gran intervalo de salinidad (3-31% NaCl) y temperaturas en un rango de 0°C a 38°C (Garofalo, 2011); de hecho, debido a estas características fue el primer género de microalga cultivado a gran escala para la producción de productos de alto valor (β -caroteno) (Ben-Amotz y Avron, 1982; Garofalo, 2011). Así como también a la facilidad de crecimiento del cultivo, la acumulación de altos niveles de caroteno (Borowitzka y Siva, 2007; Venkatesan y col, 2013) y a que son capaces de acumular ácidos grasos en su interior (10% peso seco) como respuesta al estrés osmótico del medio (Garofalo, 2011; Khalifa, 2013).

a *Dunaliella tertiolecta*

El género *Dunaliella* fue nombrado en honor al Científico Francés

Cuadro 1. Clases de microalgas de mayor importancia actualmente en la industria

	<p>Diatomeas (<i>bacillariophyceae</i>) Estas microalgas dominan en los océanos, pero también son encontradas en aguas dulces y salobres. Las diatomeas contienen sílica en su pared celular. Utilizan el carbono como fuente de almacenamiento de forma de aceites naturales y polímeros de carbohidratos (β-glucanos). Los pigmentos que se encuentran en mayor proporción son clorofila <i>a</i> y <i>c</i>, y algunos carotenos como fucoxantina. En la imagen se muestra la diatomea <i>Phaeodactylum tricornutum</i>.</p>
	<p>Algas verdes (<i>chlorophyceae</i>) Se encuentran en gran abundancia, especialmente en aguas dulces y se reproducen como células individuales o en colonias. Comparten mucha similitud con las plantas superiores, incluyen la presencia de células flageladas asimétricas. Contienen mayormente clorofila <i>a</i> y <i>b</i>. El almidón es su principal fuente de almacenamiento, aunque los aceites se pueden producir bajo ciertas condiciones de cultivo.</p>
	<p>Algas verde azules (<i>cyanophyceae</i>) Son microorganismos procariotas fotoautótrofos, presenta una célula muy similar a las bacterias. Juegan un papel importante en la fijación de nitrógeno de la atmósfera y son encontradas en diferentes ambientes. Además de la clorofila <i>a</i> de las bacterias, presentan otros pigmentos como ficoeritrina y ficocianina. Se muestra la microalga filamentosa <i>Spirulina arthrospira platensis</i>.</p>

Adaptado de Garofalo (2011); Egardt y col (2012).

Michel Félix Dunal quien en 1837 fue el primero en describirlo (Venkatesan y col, 2013). Este género comprende organismos unicelulares de color verde, biflagelados, de forma variable que pueden ser elipsoide, ovoide casi esférica, piriforme o fusiforme (Borowitzka y Siva, 2007). Estas microalgas presentan un tamaño celular de 8-25 μm de longitud y de 5-15 μm de ancho; se desplazan en el agua por medio de dos flagelos situados en la parte apical de la célula. *Dunaliella*, a diferencia de otras microalgas, carece de paredes rígidas de polisacáridos y está cubierta por una fina membrana elástica (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Preetha y col, 2012), lo que les permite soportar cambios drásticos en su volumen celular en respuesta a cambios de presión osmótica; estos organismos son únicos en su habilidad para adaptarse a diferentes condiciones del medio ambiente (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Hosseini y Shariati, 2009). Se reproducen por división longitudinal de la célula móvil, o por fusión de dos células móviles para formar un cigoto (Lewis y McCourt, 2004).

Las células de *Dunaliella* tiene otros orgánulos típicos de las microalgas verdes: núcleo unido a la membrana, mitocondrias, vacuolas y aparato de Golgi (Ben-Amotz y Avron, 1982). Este género puede encontrarse comúnmente en todas partes del mundo, desde ambientes tropicales hasta templados. Diferentes especies de *Dunaliella* han sido aisladas de diversos hábitats marinos, como lagos, aguas salinas artificiales, donde el contenido de sal es mayor al 10% (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Hosseini y Shariati, 2009; Preetha y col, 2012). Se ha reportado que las microalgas del género *Dunaliella* sirven como una fuente importante de alimento para el camarón, así como una fuente de carbono para

las halobacterias, debido a esto se considera como el principal productor primario en las aguas saladas (Oren, 2005). En el cultivo de *Dunaliella* se utilizan comúnmente diferentes medios destacando el medio f/2 (Guillar y Ryther, 1962), medio modificado Johnson (Borowitzka y Borowitzka, 1988), medio artificial (ART) (Ben-Amotz y Avron, 1982), provasoli medio de agua de mar enriquecida (PES) (Mclachlan, 1973); el objetivo principal de utilizar estos medios es debido a que presentan la limitante de algunos nutrientes, lo cual, se ha reportado ayuda a inducir la síntesis de carotenoides, principal producto de interés comercial. Los requerimientos principales para el cultivo de este género son: la luz ya que para estos microorganismo es una única fuente de energía para su metabolismo (Borowitzka y Borowitzka, 1989); en cuanto a la temperatura presentan un amplio rango de 0-45°C, pero su temperatura óptima es entre 25-35°C; respecto a los nutrientes puede usar solamente dióxido de carbono y bicarbonato como fuente de carbono inorgánico, otros elementos que requiero para su crecimiento son K⁺, Ca⁺², Mg⁺², Cl⁻, Na⁺ y metales traza (Hossini y Shariati, 2009). Debido a que *Dunaliella* presenta la ventaja de soportan altas concentraciones de NaCl, pueden realizarse cultivos tanto en lagunas abiertas como biorreactores cerrados (Hosseini y Shariati, 2009).

El género *Dunaliella* incluye alrededor de 30 especies (**Fig 1**), de las cuales, 25 han sido encontradas en aguas saladas (*D. marítima*, *D. polimorfa*, *D. primolecta*, *D. quartolecta*, *D. tertiolecta* entre otras) y cinco especies en agua dulce (*D. acidofila*, *D. lateralis*, *D. flagelata*, *D. obliqua*, *D. paupera*) (Guiry y Guiry, 2008; Venkatesan y col, 2013). *Dunaliella* se caracteriza por la predominancia de pigmentos como la clorofila a y b, y puede acumular

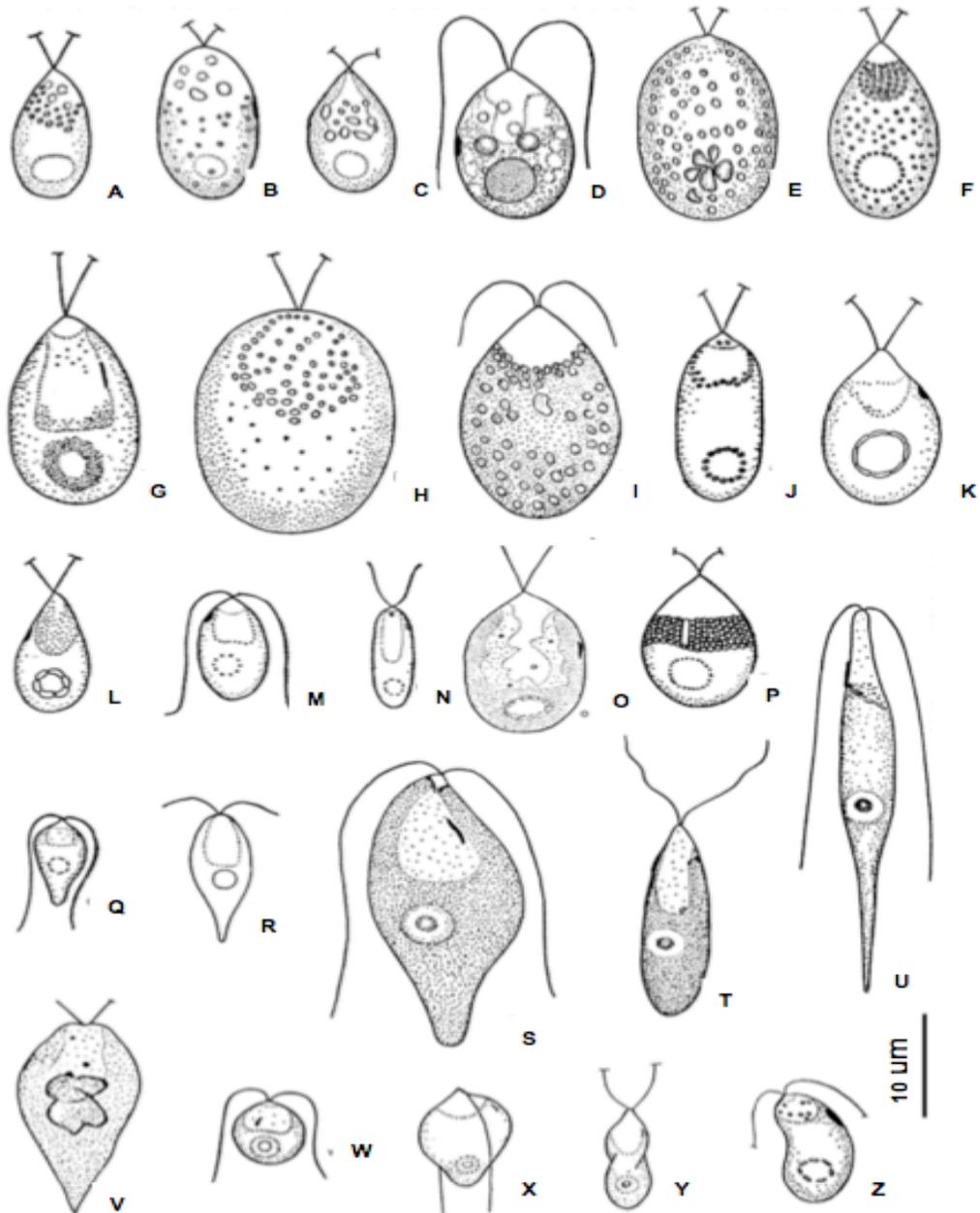


Fig 1. Diferentes especies de microalgas del género *Dunaliella*. (A-B) *D. tertiolecta*; (C) *D. primolecta*; (D) *D. quartolecta*; (E-J) *D. sanina ssp salina*; (K-M) *D. viridis*; (N) *D. minuta*; (O) *D. carpatica*; (P) *D. granulata*; (Q) *D. terricola*; (R) *D. media*; (S) *D. rueineniana*; (T) *D. baasbeckingii*; (U) *D. gracilis*; (V) *D. peircei*; (W) *D. minutissima*; (X-Y) *D. turcomanica*; (Z) *D. asymmetrica*. Adaptado de Borowitzka y Siva (2007).

una gran cantidad de carotenoides dependiendo de las condiciones de cultivo (Housseini y Shariati, 2009). Entre sus principales pigmentos se encuentran α -caroteno, β -caroteno, luteína, anteraxantina, violaxantina, zaexantina y neoxantina (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Hosseini y Shariati, 2009). De acuerdo a Borowitzka y Siva (2007), *D. tertiolecta* presenta la siguiente descripción taxonómica:

Dominio Eukaryota

Reino Protista

División Chlorophyta

Clase Chlorophyceae

Orden Dunaliellales

Familia Dunaliellaceae

Género *Dunaliella*

Especie *Dunaliella tertiolecta*

Dunaliella tertiolecta se cultiva comercialmente para fines nutracéuticos y otros productos como hidrocarburos, ácidos grasos, ficocoloides, moléculas bioactivas y productos químicos. En investigación realizadas a *D. tertiolecta* reportan diversas condiciones de desarrollo de la microalga, identificación de compuestos con bioactividad, así como algunos métodos de obtención de compuestos de alto valor para la industria (Acacio-Chirino y col, 2013; Jesus-Raposo y col, 2013; Barba y col, 2015). Entre las investigaciones que mas destacan se pueden mencionar:

Abalde y Fabregas (1991) observaron las variaciones en el β -caroteno,

vitamina C y E en *D. tertiolecta*, al variar las fuentes de nitrógeno (Nitrato, Nitro, Amonio, Urea) del medio del cultivo; obteniendo el mayor valor de β -caroteno y vitamina C al utilizar urea en el medio de cultivo, sin embargo, los cultivos de urea muestran el valor mínimo para la vitamina E. En un estudio realizado por Fábregas y col (1995) evaluaron la composición química de *D. tertiolecta* al variar dos concentraciones de nitrógeno, utilizando un cultivo semi-continúo con luz/oscuridad; en dicho estudio se observó que la microalga posee una alta capacidad de cambiar su composición química en sistemas continuos, lo cual tiene implicaciones de interés para la utilización de cultivos continuos de microalgas y sus aplicaciones en procesos biotecnológicos.

Carballo-Cárdenas y col (2003) evaluaron el efecto de la luz en la producción de vitamina E (α -tocoferol) en *D. tertiolecta*, concluyendo que la disminución de la luz no es un limitante para la producción de α -tocoferol, esto abre la oportunidad de poder utilizar altas densidades celulares en cultivos limitados de luz para la producción de α -tocoferol a nivel comercial. Además, Francavilla y col (2010) analizaron la microalga *D. tertiolecta* con el fin de evaluar un nuevo potencial industrial de esta microalga como fuente de fitoesteroles. En dicha investigación variaron la concentración de sal del medio de cultivo sobre el rendimiento de los esteroides; concluyendo que se obtienen mayores rendimientos de esteroides total cuando se utilizan menores concentraciones de sal.

Otro estudio fue el realizado por Tang y col (2011) evaluaron la influencia de la fuente luz, intensidad luminosa, concentración de CO₂ y fotoperiodo en el crecimiento de *D. tertiolecta* y el efecto de estos parámetros ambientales en el

contenido de lípidos y composición de ácidos grasos. En la investigación se concluyó que las diferentes fuentes de luz e intensidades no afectaron significativamente la composición de lípidos; los ácidos grasos que se encontraron en mayor proporción son ácido linolenico y palmitico, por lo que se ha sugerido, que éstos podrían ser usados para la producción de biocombustibles. López-Elías y col (2013) variaron diferentes condiciones de cultivo (bajo condiciones de laboratorio y al exterior, empleando medios de cultivo limitados de nitrógeno) de *D. tertiolecta*, con el fin de evaluar el crecimiento celular y la producción de carotenoides; encontrando que la concentración de carotenoides aumentó cuando *Dunaliella tertiolecta* fue cultivada en un medio limitado de nitrógeno, pero disminuyó considerablemente su densidad.

En la investigación realizada por Venkatesan y col (2013) evaluarón las microalgas *D. Salina* y *tertiolecta*, con el objeto de observar y comparar los cambios en la composición química y concentración de pigmentos (carotenoides, clorofila *a* y *b*) de cada microalga, al utilizar el medio de cultivo De Walne's; concluyendo que la microalga *D. tertiolecta* es útil para obtener una mayor concentración de biomasa, debido a que alcanza un mayor contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos y un mayor crecimiento celular en comparación con *D. salina*.

3 Composición química de microalgas

Desde el punto de vista nutricional, la biomasa de las microalgas se consideran como alimentos funcionales capaces no solo de elevar el contenido nutricional de los alimentos tradicionales (**Cuadro 2**), sino también de

Cuadro 2. Composición general de diferentes microalgas y comparación de valores de fuentes tradicionales de alimento

Especies	Contenido (% , bs)		
	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
<i>Chlorella vulgaris</i>	41-58	12-17	14-22
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	18-33	5-18	4-17
<i>Dunaliella salina</i>	38-52	7-10	8-12
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	29-36	5-31	7-11
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Nannocloropsis sp.</i>	12-29	28-36	12-53
<i>Synechococcus sp.</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Snedemus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina plantensis</i>	42-63	8-14	4-11
Fuentes tradicionales de alimento			
Arroz	6-8	43-77	1-2
Carne	21-43	2-5	3-21
Huevo	12-16	2-4	9-11
Leche	3-5	4-6	3-5
Soya	32-37	23-30	20-25

Adaptado de Chacón-Lee y González (2010); Sydney y col (2010); Dragone y col (2010); Priyadarshani y Rath (2012); Salazar-Pérez (2012); FAO (2014).

incidir positivamente en la salud de animales y humanos, ya que son una fuente de macronutrientes (proteínas, carbohidratos, lípidos) y micronutrientes (vitaminas y minerales) (Guedes y col, 2011b). El contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos de las microalgas varía con relación a las condiciones ambientales como: concentración de nutrientes, temperatura, intensidad luminosa, estado fisiológico, edad y densidad de la población, desarrollo autotrófico o heterotrófico (Band-Schmidt 1999). En general el contenido de proteínas en las microalgas se encuentra entre 18-63%, estos niveles son comparables con los encontrados en vegales como la soya (alrededor de 30%) (Babadzhanov y col, 2004; Samarakoon y Jeon, 2012). El contenido de proteínas es relativamente bajo en microalgas cafés (10-21%), pero es alto en microalgas verdes (12-63%) y rojas (5-35%) (Holdt y Kraan 2011). La mayoría de las proteínas presentes en las microalgas contienen un buen balance de aminoácidos esenciales y son, en particular, una rica fuente de ácidos aspártico y glutámico (Fleurence, 1999).

Diferentes grupos de microalgas producen tipos específicos de carbohidratos, por ejemplo, las microalgas verdes producen almidón como fuente de energía, de manera similar a las plantas superiores (Williams y Laurens, 2010). La concentración total de carbohidratos varía de un 4-76% en base seca (Holdt y Kraan, 2011). Los principales carbohidratos encontrados en microalgas son monosacáridos tales como glucosa, galactosa, manosa, xilosa, ribosa y ramosa, disacáridos y polisacáridos como el almidón (Garofalo, 2011).

El contenido de lípidos presente en las microalgas varía entre un 1-70%, aunque algunas especies pueden alcanzar, inclusive hasta un 90% bajo

condiciones de estrés ambiental o limitación de nutrientes (Guedes y col, 2011b). Los lípidos presentes en microalgas se encuentran como ceras, esteroides, vitaminas liposolubles (A, D, E y K), mono-, di-, y triglicéridos, glicolípidos y fosfolípidos (Williams y Laurens, 2010). Además, son fuente de ácidos grasos poliinsaturados como los omega 3, [Docosahexaenoico (DHA), Eicosapentaenoico (EPA) y alfa-Linolénico (ALA)] (Guedes y col, 2011b).

Las microalgas concentran elementos esenciales en los que se incluyen: Potasio, Zinc, Sodio, Magnesio, Hierro, Cobalto, Azufre, Fósforo, Nitrógeno y Calcio. Así como también son fuente de vitaminas como: A, B1, B2, B3, B9, C, D, E y H (Bishop y Zubeck, 2012, Priyadarshani y Rath, 2012; Francavilla y col, 2015). En cuanto al contenido de pigmentos, las microalgas presentan tres clases de pigmentos naturales que son la clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas (**Fig 2**) (Avagyan, 2008; Guedes y col, 2011a).

Se ha reportado que las microalgas presentan un alto contenido de fibra (alrededor del 33-62%), estos polisacáridos son muy diversos en estructura y composición química. La fracción soluble esta compuesta principalmente por agar, ácido algínico, furosona, lamiraran y forfirano; y la fracción insoluble por celulosa, mananos y xilanos (Guedes y col, 2014). El consumo de fibra dietética tiene una influencia positiva en aspectos relacionados a salud, reduciendo el riesgo de sufrir cáncer de colón, hipercolesterolemia, obesidad y diabetes (Suzuki y col, 2004; Guedes y col, 2014).

4 Cultivo de microalgas

Los factores de cultivo que principalmente determinan el crecimiento de las microalgas y las tasas de formación de productos, son la calidad y la cantidad de

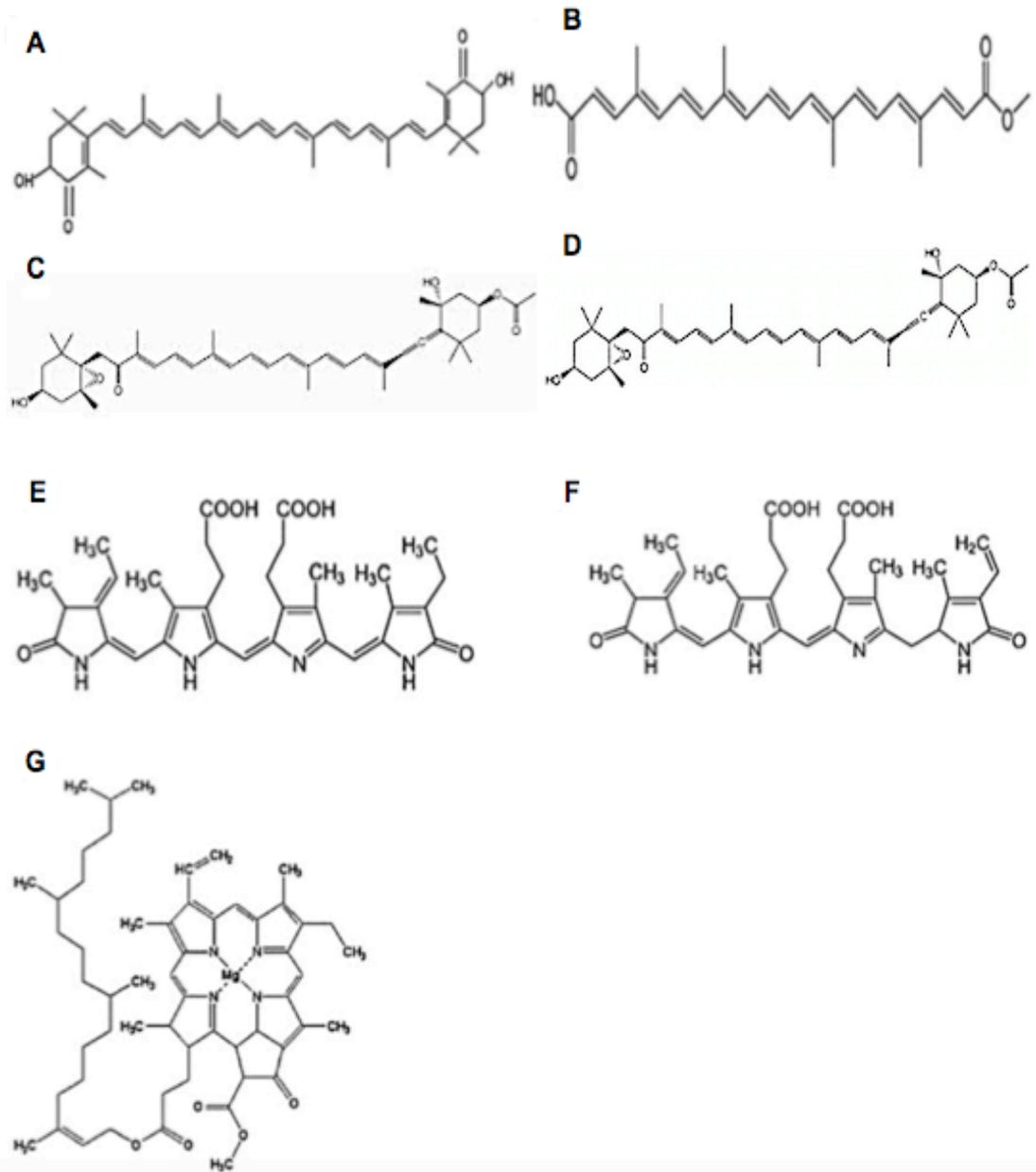


Fig 2. Pigmentos de importancia en microalgas: (A) Astaxantina; (B) Bixina; (C) Violaxantina; (D) Fucoxantina; (E) Ficocianina; (F) Ficoeritrina; (G) Clorofila a. Los pigmento A, B, C y D son carotenoides, mientras que E y F son ficobilinas. Tomado de Koller y col (2012).

nutrientes (que abarca desde la importación de CO₂ hacia el sistema de cultivo); la alimentación de luz, donde el rango espectral y el fotoperiodo son factores cruciales y tienen que ser optimizado para todas las especies de microalgas, mientras que la intensidad de la luz debe variar en el rango de 1,000-10,000 luxes. Esta última es de suma importancia para evitar la limitación de luz que resulta en los llamados "reacciones oscuras" de las células por utilización de oxígeno molecular, así como foto-inhibición por excesiva irradiación con fotones que podrían incluso causar daños graves en las células. Además, la salinidad (12-40 g/L), valor de pH (4-11), la agitación (30-60 rpm) y de temperatura (16-27°C), son determinantes para el crecimiento celular y la formación de productos (Díaz- y Ordoñez, 2006; Sierra y col, 2008; Loera-Quezada y Olguín, 2010). En el cultivo de microalgas se busca obtener, a través del suministro de una dieta y condiciones específicas, la máxima tasa de crecimiento posible de la especie en cultivo, con lo cual debe lograr la optimización de las instalaciones, del tiempo de cultivo y de la biomasa obtenida por unidad de volumen y tiempo, que dan como resultado una reducción en los costos de producción (Sommer y col, 1991).

Durante las últimas décadas, se han desarrollado diferentes estrategias para el cultivo de microalgas. Para ello, se pueden emplear tanto reactores cerrados, generalmente llamados fotobiorreactores (FBRs), o reactores abiertos, conocidos como "Raceways" o "Lagunas Abiertas" (LA) (**Fig 3**) (Loera-Quezada y Olguín, 2010). Los fotobiorreactores permiten el cultivo de las microalgas en condiciones controladas de nutrientes, temperatura, transferencia de gases (CO₂ disuelto), pH, evaporación del medio de cultivo y prevención de agentes contaminantes, permitiendo alcanzar una productividad alta; sin embargo, tienen

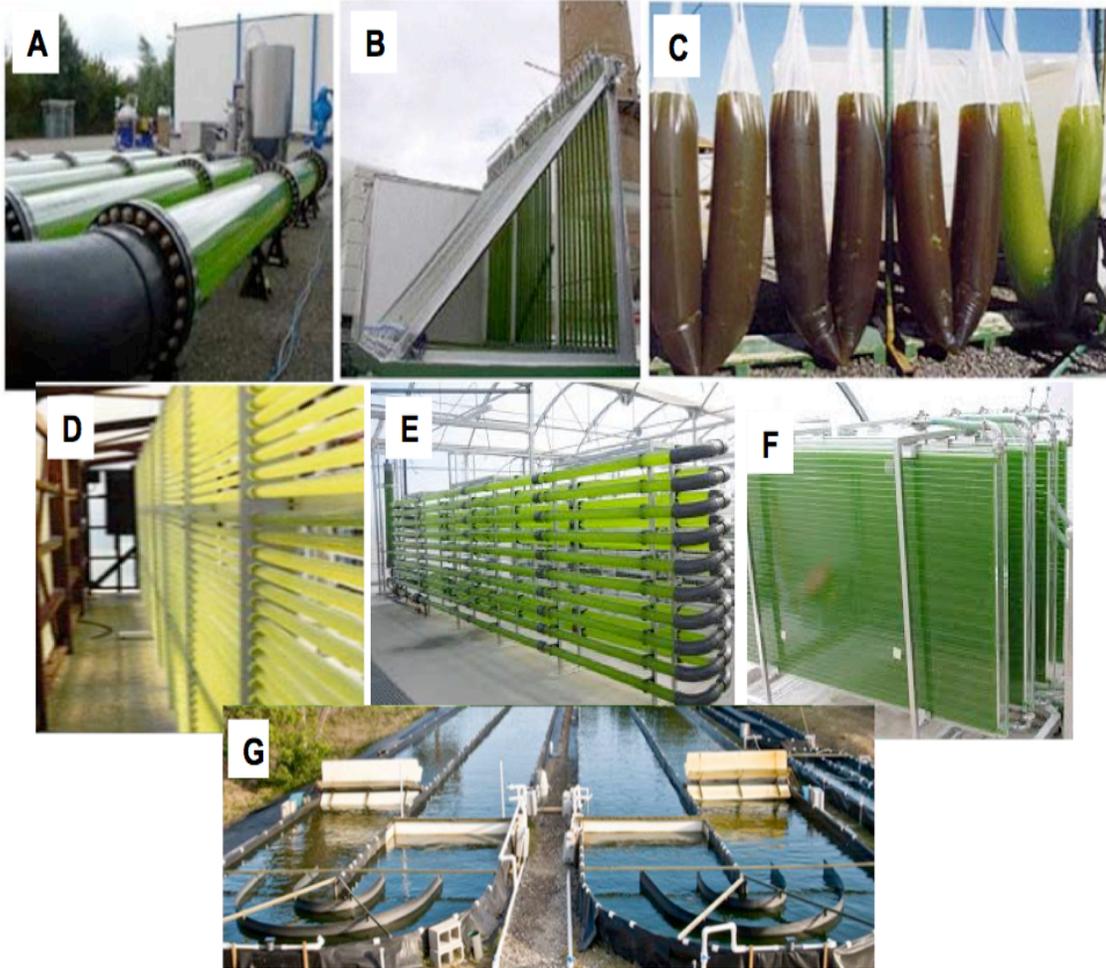


Fig 3. Tipos de reactores para el cultivo masivo de microalgas. A) FBR tubular; B) FBR tubular; C) FBR bolsas de polietileno D-E) Tecnología Vertical de microalgas (TVM); F) FBR tipo placa y G) Lagunas abiertas (LA) también conocidas como “Raceways”. Adaptado de Loera-Quezada y Olguín (2010); Garofalo (2011).

un costo inicial alto y son muy específicos para la fisiología de la especie de microalga que se va a cultivar (Harun y col, 2010). Por otra parte, los sistemas de cultivo abiertos presentan una serie de inconvenientes debido al escaso control de las condiciones de cultivo como la intensidad de la luz, temperatura, pH y la concentración de oxígeno disuelto, además de problemas con contaminantes y predadores que pueden limitar el sistema de cultivo. Debido al escaso control que implican los sistemas abiertos, se requiere una aclimatación local, que estará por la localización elegida. A pesar de esto, el uso de los sistemas de cultivo abierto es bastante común, debido principalmente al bajo costo inicial que presentan (Harun y col, 2010). El cultivo de microalgas se puede llevar a cabo mediante diversos modos de operación, caracterizados principalmente por la forma en que el sustrato se alimenta al tranque (discontinuo o batch, semicontinuo o fed-batch, continuo) (Gotham y Rhee, 1982; Lodi y col, 2005). Se ha demostrado que la operación en continuo es una opción viable para el cultivo de microalgas, ya que de este modo se alcanzan mayores productividades, se facilita una elevada homogeneidad del producto y una mayor regularidad de la producción. No obstante, su mantenimiento y control es difícil y por lo tanto, se opta principalmente por el cultivo semicontinuo (Gotham y Rhee, 1982).

El cultivo discontinuo, o batch, es aquel en donde las células se cultivan en un recipiente con una concentración inicial, sin que esta sea alterada por nutrientes adicionales o el lavado, por lo que el volumen permanece constante y sólo las condiciones ambientales del medio (pH, temperatura, la velocidad de agitación, etc.) son controladas por el operador. El proceso finaliza cuando todo

el sustrato es consumido por la biomasa. Esta forma de cultivo es simple y se utiliza extensamente tanto en el laboratorio como a escala industrial (Koller y col, 2012).

En el cultivo semi-continúo, o Fed-batch, los nutrientes son alimentados al biorreactor de forma continua o semi-continúa, mientras que no hay efluente en el sistema. La técnica semi-continúa prolonga el uso de tanques grandes de cultivo mediante una cosecha parcial periódica seguida, inmediatamente, por el llenado del cultivo hasta alcanzar el volumen original; agregando también nutrientes para alcanzar el nivel original de enriquecimiento. Estos cultivos pueden hacerse en ambientes cerrados o al aire libre, pero, por lo general su duración es impredecible; este cultivo no se cosecha completamente por lo que está restringido por la capacidad volumétrica del reactor (Salazar-Pérez 2012).

Finalmente, el cultivo continuo el cultivo consiste en alimentar nutrientes y retirar productos continuamente de un biorreactor. Así, bajo ciertas condiciones, el cultivo puede alcanzar un estado estacionario, donde los productos son producidos continuamente en cantidades y calidad constante. Éste se caracteriza por concentraciones invariables de sustrato y producto, así como valores de dilución y tiempos de residencia constantes en el sistema de cultivo (Koller y col 2012; Atlic y col 2011).

Dependiendo del tipo de metabolismo utilizado por las microalgas para su crecimiento, la fuente de carbono puede ser orgánica (glucosa, acetato, glicerol, fructosa, entre otras), o inorgánica (CO_2). Con base a lo anterior, las condiciones de cultivo se definen como heterotróficas, autotróficas y mixotróficas (Arias-Peñaranda y col, 2013) **(Fig 4)**. En las condiciones de cultivo

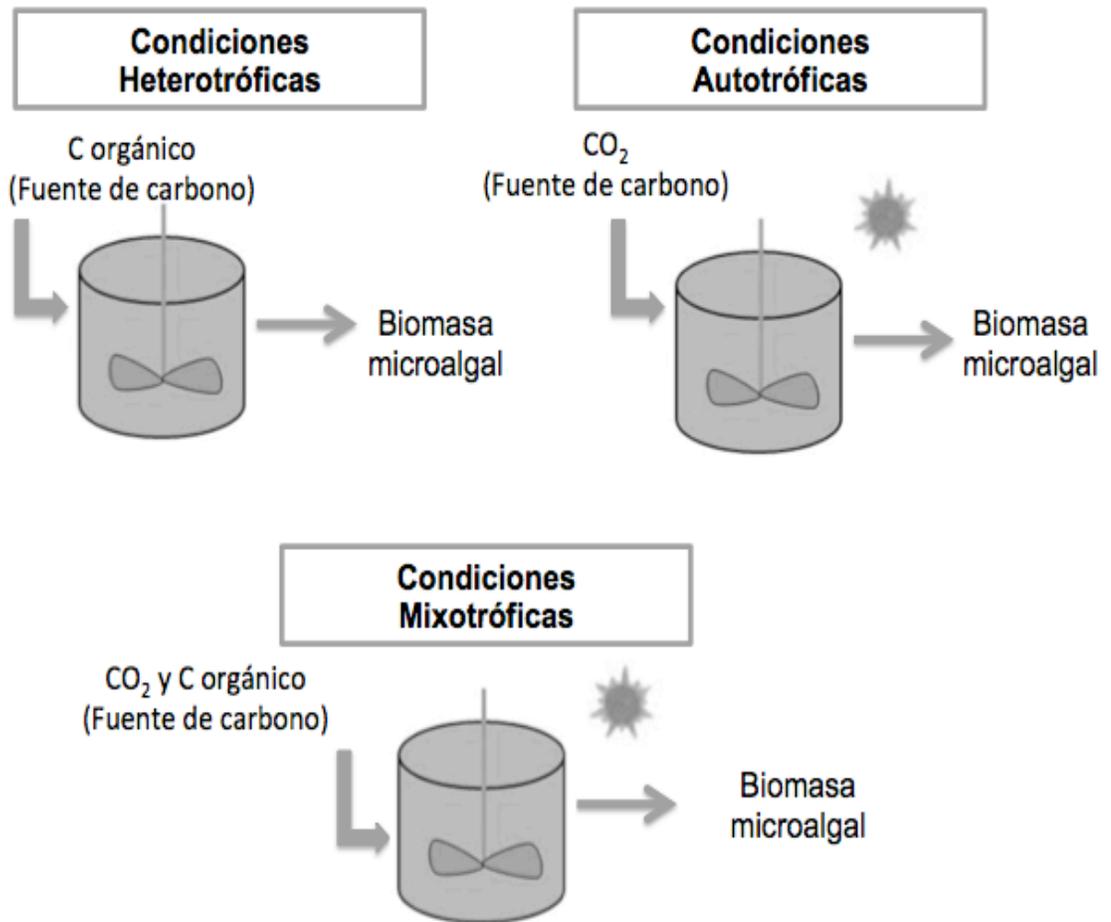


Fig 4. Diferentes condiciones para el cultivo de microalgas. Adaptado de Koller y col (2012).

heterotrófico, las microalgas, en ausencia de luz, utilizan solo compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía (Chojnacka y Marquez, 2004); el cultivo autotrófico, utilizan la luz como fuente de energía y el CO₂ como fuente de carbono para obtener energía química a través de la fotosíntesis (Huang y col, 2010). Mientras que en el cultivo mixotrófico, las microalgas utilizan tanto carbono orgánico como inorgánico y captan la energía de la luz y del carbono orgánico (Chen y col, 2011).

Las condiciones autotróficas han sido las más utilizadas para el cultivo de microalgas con fines de obtención de biodiesel, y existe una gran variación en el contenido de lípidos obtenidos bajo estas condiciones, que van desde el 11% al 63% (Arias-Peñaranda y col, 2013). Se ha reportado que la combinación de condiciones de cultivo heterotróficas y autotróficas parece ser una estrategia de eficiencia alta ya que produce concentraciones altas de biomasa utilizando una fuente de carbono barata (Koller y col, 2012).

5 Cosecha de microalgas

Aunque se sabe que la producción de microalgas es un proceso con grandes beneficios, uno de los problemas que presenta son los costos de producción elevados y los retos en el cultivo a gran escala (Molina y col, 2003). La clave del reto, está en la cosecha eficiente de células de microalgas a escala industrial. Se estima que al menos 20-30% del costo total de la producción de la biomasa puede atribuirse a los procesos de recuperación de la biomasa (Gudin y Thepenier, 1989; Kim y col, 2015a); consecuentemente, las estrategias de cosecha están basadas en métodos que utilicen poca energía, esto con el fin de resolver el problema y lograr la producción de microalgas de forma

economicamente viable (Sirin y col, 2012). Existen diversos métodos para la cosecha de microalgas, tales como la centrifugación, formación de biopelículas, filtración, sedimentación por gravedad, método electrolítico y la floculación (Christenson y Sims, 2012). Evaluaciones a los diferentes métodos de cosecha han mostrado que la floculación combinada con la sedimentación, y la subsecuente eliminación de agua por centrifugación o filtración, es la alternativa hasta hoy más eficiente en cuanto a costo y energía (Schenk y col, 2008).

Durante la floculación, las células de microalgas dispersas se agregan y forman grandes partículas, ésto debido a la interacción del floculante con la carga superficial de las células, y la subsecuente coalescencia de estos agregados en grandes flóculos que se depositan fuera de la suspensión (Knuckey y col, 2006). Los mecanismos de floculación dependen principalmente de las interacciones entre las cargas de la superficie celular y del floculante (Sirin y col, 2012). Hasta hoy, un gran número de floculantes han sido empleados, tales como polímeros orgánicos, biofloculantes, floculación inducida con pH (hidróxido de magnesio, hidróxido de sodio ó fosfato de calcio), y floculantes de naturaleza inorgánica como sales metálicas (sulfato de aluminio, cloruro férrico, cloruro de aluminio, sulfato férrico, entre otros) (Liu y col, 2014); siendo estos últimos generalmente empleados en los procesos de floculación ya que permiten alcanzar altos porcentajes de eficiencia, sin embargo, se ha demostrado que éstos liberan partículas residuales en la biomasa, limitando su potencial empleo en la industria alimentaria. Para evitar lo anterior, una alternativa importante sería el empleo de floculantes de naturaleza orgánica como el quitosano (Salim y col, 2011).

En las últimas décadas, el quitosano ha surgido como un agente biofloculante favorable, el cual es usado como un polisacárido catiónico en la cosecha de microalgas; éste puede ser aislado a partir de hongos, ó puede obtenerse por desacetilación de la quitina, principal componente en el exoesqueletos de los crustáceos (Ahmad y col, 2011). La quitina es uno de los polímeros naturales más abundantes del mundo, sólo después la celulosa. Comparado con los floculantes inorgánicos disponibles, el quitosano ha tomado gran relevancia en la actualidad, ya que además de tratarse de un compuesto orgánico, presenta varias ventajas, entre ellas: la floculación de partículas más grandes, incrementos en la velocidad de sedimentación, obtención de soluciones residuales más claras, alta eficiencia de floculación, además de no afectar la composición ni toxicidad de los productos, lo cuál hace posible su utilización para diversos fines (Knuckey y col, 2006). La biomasa de microalgas, obtenida mediante este método de cosecha, puede ser utilizada en la producción de biocombustibles, productos químicos, ó alimentos; inclusive, el agua de desecho generada puede ser reutilizada para propio cultivo de microalgas (Ahmad y col, 2011).

6 Usos de la biomasa microalgal

Las naciones que tienen una larga historia en el manejo y empleo de los cultivos de microalgas, principalmente en aplicaciones para alimentos, fertilizantes, alginatos, y productos farmacéuticos incluyen a China, Japón, Filipinas, Corea, Indonesia, Chile, y Europa en los países costeros como Francia, Reino Unido, Noruega y Portugal (Egardt y col, 2012).

En la actualidad el empleo de la biomasa microalgal cada vez se vuelve

más importante como fuente de alimento, especialmente por ser rica en proteínas y minerales, por lo cual puede ser usada en la acuicultura para alimentación animal. Sin embargo, aún falta estudiar la biomasa microalgal para conocer sus beneficios (Egardt y col, 2012). Además, ha recibido atención por ser fuente de compuestos bioactivos, tales como pigmentos, antioxidantes, polisacáridos, triglicéridos, ácidos grasos, vitaminas y biopéptidos (Maadane y col, 2015).

Una visión general de las aplicaciones de la biomasa microalgal que dan frecuentemente a la biomasa de microalgas se muestra en la **Fig 5**. Dicha biomasa, presenta un amplio espectro de actividades biológicas de importancia, incluyendo propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y antioxidantes (Frikha y col, 2011). Los compuestos responsables de este tipo de actividades, son ampliamente empleados como productos en diferentes sectores industriales, tales como farmacéuticos, cosméticos y alimentos funcionales, entre otros (**Cuadro 3**) (Jaramillo-Obando, 2011; Maadane y col, 2015).

La biomasa microalgal se ha empleado en la agricultura como biofertilizante y como enriquecedor de suelos, las especies de microalgas de cuya biomasa se obtiene esta aplicación son las cianobacterias, y su importancia radica en la capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico, además de producir otros efectos positivos en las plantas y el suelo. Esta característica se debe a que después del agua, el nitrógeno es el segundo factor limitante para el crecimiento de las plantas, y la deficiencia de este elemento es aportada por los fertilizantes (Priyadarshani y Rath, 2012).

Microalgas tales como *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* y

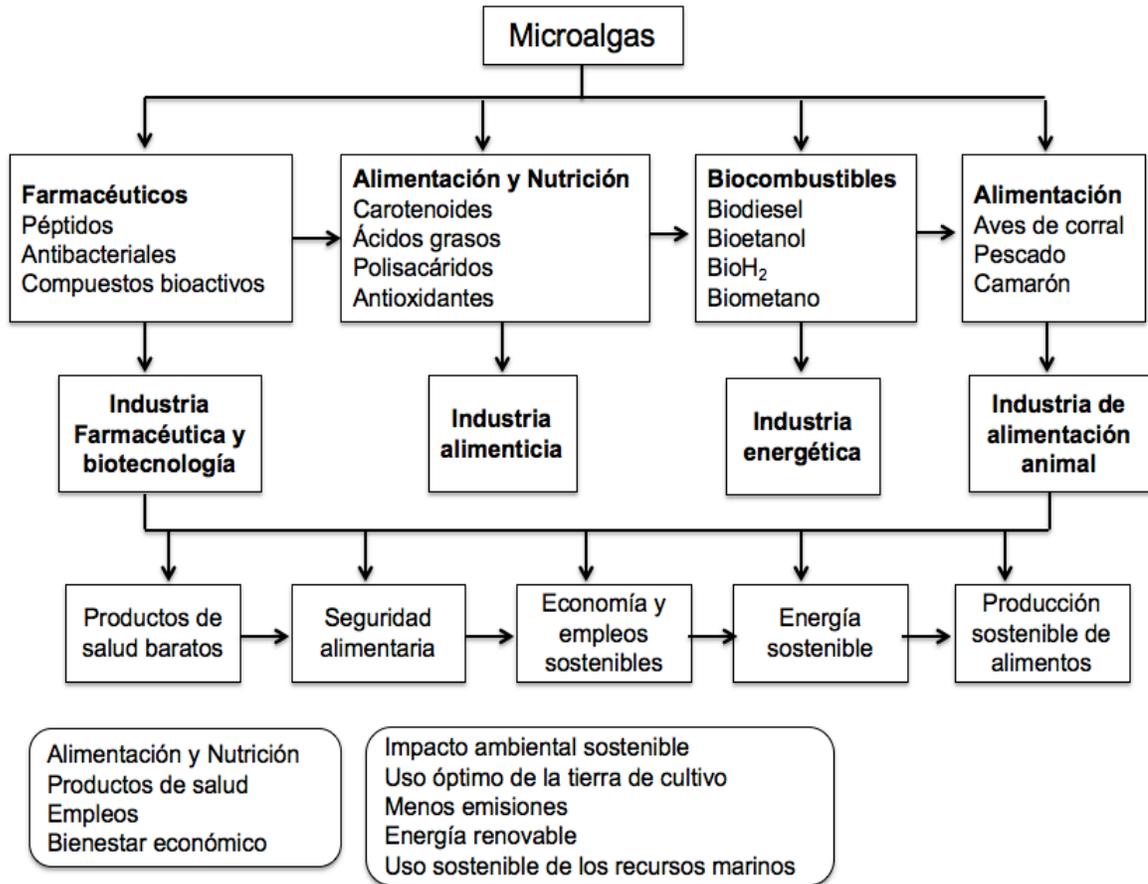


Fig 5. Aplicaciones generales para el uso de la biomasa de microalgas. Tomado de Gouveia (2014).

Cuadro 3. Aplicaciones en la salud de compuestos bioactivos presentes en la biomasa de las microalgas

Grupo de compuestos	Compuestos bioactivos	Actividad	Aplicaciones en la salud
Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)	Ácido eicosapentanoico (EPA)	Nutracéutico Antimicrobiológico Antiinflamatorio	Suplementos alimenticios
	γ-Ácido linolenico (GLA)	Integridad de tejidos	Terapéuticas
	Ácido araquidónico (ARA)		Aditivos en alimentos
	Ácido docosahexanoico (DHA)		
Esteroles	Brassicasterol Campesterol Estigmasterol Sitoesterol	Hipocolesterolémica	Farmacéuticas
Pigmentos	β-Caroteno Astaxantina Cantaxantina Ficocianina Ficoeritrina	Antioxidante Antiinflamatorio Suplementos alimenticios	Farmacéuticas Tratamiento dolor muscular
Proteínas Enzimas	Biopéptidos Superóxido dismutasa (SOD)	Antioxidante Antiinflamatorio	Suplementos alimenticios Terapéuticas
Vitaminas	A, B ₁₂ , C, E y K	Antioxidante	Sistema inmune
Otros compuestos	Karantungiol A Ciguatoxina	Antifúngica Antiprotozoaria	Farmacéuticas

Adaptado de Jesus-Raposo y col (2013)

Schizochytrium son clasificadas dentro de las fuentes de alimentos considerados GRAS (Generally Regarded as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) (Chacón-Lee y González 2010). La aceptación de la utilización de la biomasa de microalgas, o biomoléculas que se extraen de ella ha dado lugar al desarrollo de varios productos alimenticios innovadores enriquecidos con microalgas o sus subproductos (Priyadarshani y Rath 2012).

Hasta el momento, pocos productos aparecen en los estantes del sector salud y productos naturales, por lo tanto, todavía hay una gran oportunidad sin explotar en este ámbito de los alimentos (Chacón-Lee y González-Mariño, 2010).

Gouveia y col (2006), reportaron que la incorporación de biomasa microalgal en emulsiones alimenticias no desestabiliza las propiedades estructurales, sino que puede originar efectos sinérgicos, incrementando la firmeza y reduciendo el contenido de aceite de la emulsión sin repercutir en sus propiedades estructurales y sensoriales. En un estudio en galletas realizado por Gouveia y col (2007), evaluaron la incorporación de la biomasa microalgal de *Chlorella vulgaris* y su efecto en la coloración y otras características funcionales, tales como la actividad antioxidante y el contenido de compuestos nutricionales (fibra, ácidos grasos y oligoelementos); ellos reportaron que la adición de la biomasa microalgal como ingrediente natural, proporcionó a las galletas un aspecto atractivo e innovador y mejores características de textura.

Fradique y col (2010) y Rodríguez y col (2014) incorporaron biomasa microalgal (*Chlorella vulgaris*, *Spirulina máxima*, *Spirulina plantensis*, *Spirulina spirel*) a la harina de sémola para la elaboración de pastas; encontrando que las

características de textura, la biomasa microalgal, como la firmeza, son afectadas positivamente por la inclusión de la biomasa microalgal, cuando se compararon con las pastas control. Además, presentaron colores atractivos (anaranjado y verde) debido a los pigmentos principales que existen en las algas (clorofilas, ficocianina y cantaxantina). Dicha pasta enriquecida con biomasa microalgal presentó también una capacidad antioxidante alta.

Uno de las principales usos de biomasa de microalgas es la producción de biodiesel, ya que es una alternativa con mayor viabilidad, además, de ser una fuente más amigable con el medio ambiente en comparación con otras fuentes que se han estudiado para la producción de biocombustibles. Sin embargo, en la actualidad este proceso parece ser poco rentable con más de 50 empresas de biocombustibles a partir de microalgas y ninguna aún produciendo a escala comercial y a precios competitivos (Pienkos y Darzins, 2009; Milledge, 2010). Para contribuir a la rentabilidad del proceso una alternativa, es la utilización de la biomasa residual que se obtiene en el proceso de extracción de aceite de la biomasa de microalgas. La biomasa residual contiene una gran cantidad de proteínas, carbohidratos y otros nutrientes, por lo que actualmente los retos científicos y tecnológicos están relacionados en dar respuestas creativas y rentables para lograr producir simultáneamente una serie de subproductos con valor agregado alto y de interés industrial, alimenticio y nutracéutico (proteínas, péptidos bioactivos, metabolitos secundarios, entre otros) (Milledge, 2010).

7 BIOMASA RESIDUAL (BR)

Es la biomasa que se obtiene como material de desecho después del proceso de extracción de aceite, de la biomasa completa, para la obtención de

biodiesel; algunos autores la han nombrado “pasta residual” (residual cake), “producto de desecho” (waste product), “biomasa después de extracción de aceite” (after lipid extract biomass), ó “biomasa desengrasada” (defatted biomass) (**Fig. 6**) (Lee y col, 2013b; Toro y col, 2013; Zhao y col, 2014).

Algunos investigadores han encontrado que dicha biomasa residual (BR) puede ser empleada para la producción de otros biocombustibles por su gran cantidad de polisacáridos (Lee y col, 2013a; Kim y col, 2015b; Tibbetts y col, 2015a). Sin embargo, debido a su alto contenido de proteínas, diferentes micronutrientes y microelementos, así como vitaminas, en los últimos años ha despertado su interés como alimento ó ingrediente potencial en alimentos, ya que podría resultar en productos con valor de mercado alto (Egardt y col, 2012).

En los últimos años ha aumentado el interés por la utilización de esta biomasa residual (que hoy es subproducto industrial), debido a que el reto actual en materia de energía es lograr producir biocombustibles a costos competitivos, y la mejor alternativa que se ha encontrado para la producción de biocombustibles a partir de microalgas es la utilización integral de todos los recursos presentes en la biomasa microalgal (Ramos-Suárez y Carreras, 2014).

a Composición química de la BR

La composición química de la BR, al igual que la biomasa completa, varía de una especie a otra, así como por las condiciones de cultivo y método de cosecha utilizado; además, en el caso de la BR, su composición depende directamente de la composición proximal de la biomasa completa, así como del método de extracción de aceite utilizado para la remoción de los lípidos de ésta (Lee y col, 2013b).

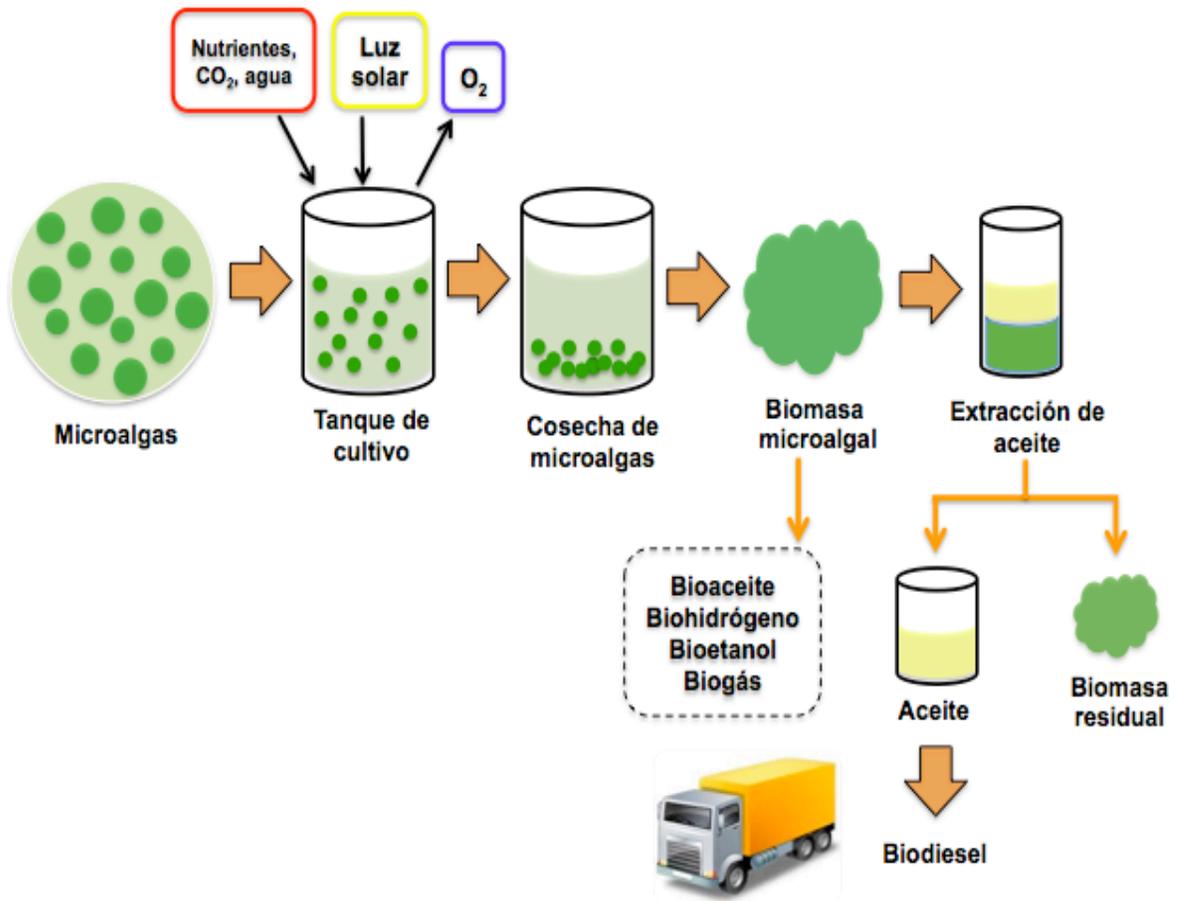


Fig 6. Proceso de transformación energética a partir de microalgas.

Adaptado de Santos-Ballardo y col (2015a).

Actualmente existen pocos trabajos donde se reporta la composición química de la biomasa microalgal después de la extracción del aceite (BR) (**Cuadro 4**).

Ehizae y col (2009) evaluaron la BR de *Chlorella sp.*, este trabajo consistió en evaluar diferentes solventes para extracción de aceite, con el fin de observar los cambios del solvente en la composición química de la BR, reportando un contenido de proteínas de 60-64%, lípidos de 0.2-1.96% y carbohidratos de 35-39%. Otro trabajo es el desarrollado por Park y Li (2012) en el que evaluaron la composición química de la BR de *Nannochloropsis salina*, reportando un contenido de proteínas de 47.9%, lípidos 14.16% y carbohidratos 4.1%. Lee y col (2013b) evaluaron la BR de *Dunaliella tertiolecta* reportando un contenido de proteínas de 52.0%. Toro y col (2013) analizaron la composición química de la BR de *Botryococcus braunii*, dicha BR presentó un contenido de proteínas alrededor de 48.0%, lípidos 4.0%, cenizas 21.1%, carbohidratos 22.6% y el contenido de fibra en un 4.4%.

Tibbetts y col (2014) caracterizaron la BR de diferentes microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Microcactinium reisseri*, *Nannochloropsis acillaris*, *Tetracystis sp.*) respecto a su composición química, reportando contenidos de proteína de 17.3-22.2%, lípidos 6.7-31.8%, cenizas 2.6-2.8%, carbohidratos 33.6-43.9% y fibra 11.4-41.3%. Además, Ramos-Suárez y Carreras (2014) evaluaron la BR de *Scenedesmus* para la producción de biogás, encontrando un contenido de proteínas de 35.6%, lípidos 29.3%, cenizas 6.5% y carbohidratos 28.5%.

Kim y col (2015b) evaluaron la composición química de la BR de la microalga *Dunaliella tertiolecta* encontrando un contenido de proteína de

Cuadro 4. Composición bioquímica de la biomasa residual de diferentes especies de microalgas

Especie	Porcentaje (%)					Referencia
	Proteínas	Lípidos	Cenizas	Carbohidratos	Fibra	
<i>Chlorella sp.</i>	60-64.0	0.2-1.96	NR	35-39.0	NR	Ehizae y col 2009
<i>N. salina</i>	47.9	14.16	NR	4.1	NR	Park y Li 2012
<i>D. tertiolecta</i>	NR	NR	NR	52.0	NR	Lee y col 2013b
<i>B. braunii</i>	48.0	4.0	21.1	22.6	4.4	Toro y col 2013
<i>C. vulgaris</i>	17.3	31.8	2.7	33.6	13.5	Tibbetts y col 2014
<i>M. reisseri</i>	18.2	27.7	2.6	35.7	11.4	Tibbetts y col 2014
<i>N. bacillaris</i>	22.2	6.7	2.8	43.9	41.3	Tibbetts y col 2014
<i>Tetracystis sp.</i>	21.9	9.4	2.7	43.2	40.2	Tibbetts y col 2014
<i>D. tertiolecta</i>	35.0	0.0	13.1	51.9	NR	Kim y col 2015b
<i>Scenedesmus</i>	35.6	6.5	28.5	29.3	NR	Ramos-Suárez y Carreras 2014
<i>N. granulata</i>	44.5	25.6	8.6	16.5	NR	Tibbetts y col 2015a

NR-No Reportado

35.0%.

Los lípidos no fueron detectados, ya que la biomasa fue previamente desengrasada y esto quiere decir que el método utilizado para la extracción fue efectivo. Respecto al contenido de cenizas se encontraron en un 13.1% y el contenido de carbohidratos de 51.9%.

Tibbetts y col (2015a) evaluaron la composición química y perfil de aminoácidos presentes en la BR de la microalga *Nannochloropsis granulata* al variar las condiciones del método de extracción, reportando un contenido de proteínas de 45 %, lípidos 25%, carbohidratos 16% y cenizas 8%. En cuanto al perfil de aminoácidos de dicha BR, los autores encontraron que no había diferencias significativas entre el perfil de aminoácidos de la biomasa completa y la BR, a excepción de lisina, dónde se observó una reducción en la BR.

En general el contenido de proteínas en la BR residual de microalgas se encuentra entre 17.3-64.0%, lípidos entre 0.0-31.8%; presentan un rango amplió en cuanto al contenido de lípidos, lo cual podría deberse al método de extracción y al tipo de solvente utilizado. El contenido de cenizas varía entre el 2.6-21.1%, carbohidratos 4.1-43.9% y fibra 4.4-41.3%. Además, en la BR de microalgas se han encontrado minerales como calcio (Ca), magnesio (Mg), fósforo (P), potasio (K) y sodio (Na); elementos traza que incluyen cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), selenio (Se) y zinc (Zn) (Ramos-Suárez y Carreras, 2014; Kim y col, 2015b). Se ha reportado en la BR la presencia de aminoácidos tanto esenciales como no esenciales (**Cuadro 5**) (Tibbetts y col, 2014).

En otras investigaciones donde se ha evaluado la BR de microalgas, se han encontrado la presencia de ácidos grasos en gran proporción destacando,

Cuadro 5. Perfil de aminoácidos presentes en la biomasa residual de microalgas

Aminoácidos	Biomasa residual de microalgas					Requerimientos para niños >3 años, adolescentes y adultos
	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Micractinium reisseri</i>	<i>Nannochloropsis bacillaris</i>	<i>Tetracystis sp.</i>	<i>Nannochloropsis granulata</i>	
Esenciales	(mg/g muestra, bs)					
Arginina	12.3	11.2	13.6	15.7	26.1	5.8
Histidina	3.9	3.4	4.1	3.8	7.8	1.60
Isoleucina	8.1	8.2	12.4	11.7	17.6	4.0
Leucina	17.3	17.6	22.1	21.7	32.4	7.0
Lisina	11.9	14.3	14.6	15.1	21.9	5.5
Metionina	4.5	0.5	0.6	4.7	8.8	3.5
Fenilalanina	10.5	10.5	15.5	16.0	19.3	6.0
Treonina	8.2	8.1	11.8	12.0	17.9	2.5
Triptofano	3.0	3.2	2.5	8.1	0.3	1.0
Valina	11.7	12.0	15.7	15.1	22.2	5.0
∑ Esenciales	91.4	89.0	113.1	123.9	174.3	---
No esenciales						
Ácido 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	---
Ácido 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	---
∑ No esenciales	97.1	93.0	120.0	119.1	189.6	---
∑ Totales	188.5	182.1	233.1	243.0	363.9	---

ND- No Detectado. Tomado de Tibbetts y col (2014); Tibbetts y col (2015a).

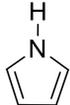
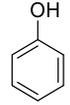
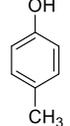
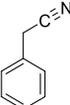
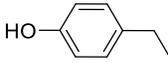
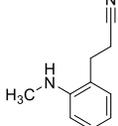
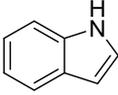
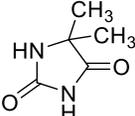
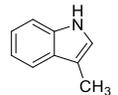
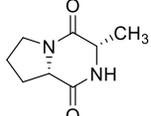
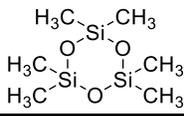
los ácidos Oleico, Linoleico y Palmítico, a los cuales se les han atribuido que aportan beneficios a la salud como propiedades anti-inflamatorias, agregando ser fuente importante de pigmentos como clorofila y carotenoides (Tibbetts y col, 2014).

b Usos

Las investigaciones hasta el momento sobre el uso de la BR se han centrado en su utilización basándose en la producción de biocombustibles como el biogas, biometano, bioetanol, entre otros (Lee y col, 2013a; Ramos-Suárez y Carreras, 2014; Zhao y col, 2014; Santos-Ballardo y col, 2015a). Sin embargo, otras investigaciones han mostrado que dicha biomasa ofrece la posibilidad de potenciar el contenido nutricional de algunos alimentos y, de esta manera, influir positivamente en la salud humana y animal, ya que esta presenta un alto contenido proteínico, es fuente de aminoácidos esenciales, ácidos grasos, vitaminas, minerales, carotenoides, azúcares y almidones de digestibilidad alta. Además del contenido bajo de grasa, estas son algunas de las razones por las cuales la BR ha sido considerada como un suplemento alimenticio de alto potencial empleo (Spolaore y col, 2006).

En la BR de *Dunaliella tertiolecta*, se han encontrado compuestos que presentan actividad antioxidante, tales como compuestos fenólicos (**Cuadro 6**), los cuales han sido altamente reconocidos por sus actividades biológicas relacionadas con propiedades terapéuticas (anticancerígenas, antibacterial, antiinflamatoria, antidiabetes) además de pigmentos como carotenoides, que son ampliamente usados como colorantes naturales en alimentos y cosméticos (Borowitzka, 2013; Tibbetts y col, 2015b). Agregando que la BR microalgal

Cuadro 6. Compuestos identificados a través de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) en biomasa residual de *D. tertiolecta*

Tiempo de retención	Tipo de compuesto	Área (%)	Estructura química
4.422	Pirrol	2.8	
4.809	Fenol	9.16	
6.936	4-metil-fenol	8.32	
8.142	Bencil nitrilo	3.67	
8.607	4-etil-fenol	0.12	
9.839	Benceno propano nitrilo	5.73	
20.64	Quelato	15.68	
20.708	5,5-dimetil-2,4-imidazolidinadiona	5.71	
22.949	3-metil indol	5.98	
26.393	Hexahidro-pirrol [1,2-a] pirazina-1,4-diona	2.31	
28.709	Hexametil-ciclotrisiloxano	15.84	

Tomado de Kim y col (2015b).

presenta un contenido de carbohidratos alto, por lo que ésta biomasa podría ser empleada en el desarrollo de productos de uso cotidiano, otorgándole un valor de mercado similar a las harinas de trigo y otros cereales; obteniendo así un producto con valor nutricional mayor, ya que no presenta deficiencia en aminoácidos como Lisina, Metionina y Triptófano (Tibbetts y col, 2014). Adicionalmente, Toro y col (2013) utilizaron la BR de la microalga *B. braunii* en la formulación de plásticos biodegradables, reportando que esta biomasa fue capaz de sustituir entre el 20 y 30% de la matrix polimérica, además resultar económico, redujo costos de producción, e incremento la competitividad de los bioplásticos.

Debido a las características que presenta la BR podría ser empleada, como ingrediente en la elaboración de alimentos del tipo funcional. Siendo esta, un área que no se ha explorado en su totalidad y que presenta grandes beneficios tanto en la producción de alimentos con alto valor en el mercado que proporcionen interesantes ventajas tecnológicas, nutricionales y de salud, que además ofrezcan propiedades sensoriales relacionadas con las características del producto (color, estructura, presencia de otros ingredientes) (Borowitzka, 2013; Cofrades, 2013).

B ALIMENTOS FUNCIONALES

1 Generalidades

La primera vez que fue utilizado el término nutracéutico fue en Japón en el año 1980, surge como una necesidad por disminuir los costos elevados de los servicios de salud, el aumento constante de la esperanza de vida y el deseo de las personas de edad avanzada por mejorar calidad de vida (Bigliardi y Galati,

2013; Corbo y col, 2014). El término se refiere a los alimentos que presentan ingredientes que ayudan a ciertas funciones específicas del organismo además de ser nutritivos (Siró y col, 2008); describiendo que todos los alimentos son funcionales hasta cierto punto, ya que todos aportan sabor, aroma y valor nutritivo (Hasler, 2002; Doyon y Labrecque, 2008). Sin embargo, los alimentos no sólo son evaluados en términos de macronutrientes y micronutrientes, sino que se analiza además su contenido de componentes activos y su papel en la prevención y tratamiento de enfermedades (Silencio, 2006). Son estos esfuerzos de investigación que han llevado al interés mundial en la creciente categoría de alimentos ahora reconocidos como "alimentos funcionales o nutracéuticos" (Hasler, 2002); los cuales se definen como aquellos alimentos que presentan sustancias químicas o biológicas activas que pueden encontrarse como componentes naturales de los alimentos o adicionarse a los mismos. Es decir, son aquellos alimentos que proveen beneficio para la salud más allá de la nutrición básica y no presentan efectos secundarios como los fármacos (Birute y col, 2009). Para lograr una dieta sana, que cubra adecuadamente nuestras necesidades, debemos aprender a combinar bien los alimentos, por este motivo, el conocimiento del valor nutrimental de los alimentos es importante para que estos tengan una mejor aceptación entre los consumidores (Juárez-Montiel y col, 2011). Actualmente esta siendo ampliamente aceptado el hecho de que las dietas ricas en frutas y vegetales tienen un impacto positivo en la salud y el bienestar (Gironés-Vilaplana y col, 2014).

Los compuestos que le proporcionan la propiedad funcional a un alimento son denominados compuestos nutracéuticos o fitoquímicos, estos son

compuestos bioactivos se encuentran presentes en las plantas, poseen un efecto potencial como antioxidante, antiestrógenos, antiinflamatorio, inmunomodulatorio, y anticarcinogénico (Cencic y Chingwaru, 2010). La función que juegan los componentes activos de los alimentos funcionales ha cambiado el papel de la dieta en la salud (Silencio 2006; Cenci y Walter 2010). La finalidad en la utilización de estos compuestos es propiciar un futuro más saludable para la humanidad, debido a que estos proveen beneficios fisiológicos en el control o la prevención de enfermedades crónicas degenerativas destacando osteoporosis, anemia, estreñimiento, disfunciones cardiovasculares, cáncer (Cencic y Chingwaru, 2010).

El futuro de la industria tanto química como alimenticia se basa en los compuestos nutracéuticos, los cuales son utilizados en la formulación de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos (Pérez-Leonard, 2006). El mercado de los nutracéuticos hasta este momento no se encuentra globalizado, y una de las razones es porque los consumidores no tienen definido si los nutracéuticos son alimentos o medicamento, por lo que llegan a ser sospechosas las propiedades saludables que estos aportan (KPMG International, 2015; Bigliardi y Galati, 2013). Además, cada país regula de diferente forma este tipo de productos; por ejemplo, la Unión Europea para que apruebe que un alimento es nutracéutico primeramente tiene que ser certificado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria para garantizar que cumple con lo que se le atribuye al producto (Doyon y Labrecque, 2008), Canadá tiene un proceso similar al de la Unión Europea; por lo que este tipo de proceso limita el desarrollo de alimentos nutracéuticos (KPMG International, 2015). En los Estados Unidos y Japón, por el

contrario, los productos nutracéuticos no tiene que pasar pruebas estrictas, siempre y cuando no tengan como fin afirmar que previene una enfermedad en particular. Japon fue el país en reconocer oficialmente a un alimento como funcional, y es el segundo país en el mercado de nutracéuticos en el mundo (**Fig 7**) (Bigliardi y Galati, 2013; Euromonitor, 2013). Estados Unidos, tiene la mayor oferta de productos nutracéuticos, debido a que su principal mercado va en relación a productos que puedan tener una función positiva en el cuerpo, por ejemplo, el jugo de mora azul puede ayudar a mejorar la memoria (**Cuadro 7**) (Whyte y Williams, 2015).

En 2014, 59% de la población Norteamericana compró alimentos premium, además, durante los últimos 10 años el consumo de alimentos frescos ha aumentado en un 20%, estos cambios en los hábitos alimenticios se han visto afectados por el estilo de vida, demografía, y a la creación de nuevas normas para la comercialización y envasado de alimentos (Sloan, 2015). Aunque se estima que en los próximos años las ventas anuales de productos nutracéuticos mostrarán aumentos, es necesario que esta industria busque atraer al consumidor, esto puede lograrse mediante el conocimiento de las ventajas que ofrecen estos productos en relación a los que se encuentran actualmente en el mercado, así como también, situándolos al alcance del consumidor.

Tanto la iniciativa privada como la pública han visto una nueva oportunidad de negocio en el desarrollo de este tipo de productos; y así compañías que ya se encontraban en el mercado se han adaptado a las nuevas necesidades del consumidor, incorporando a su línea de productos los alimentos

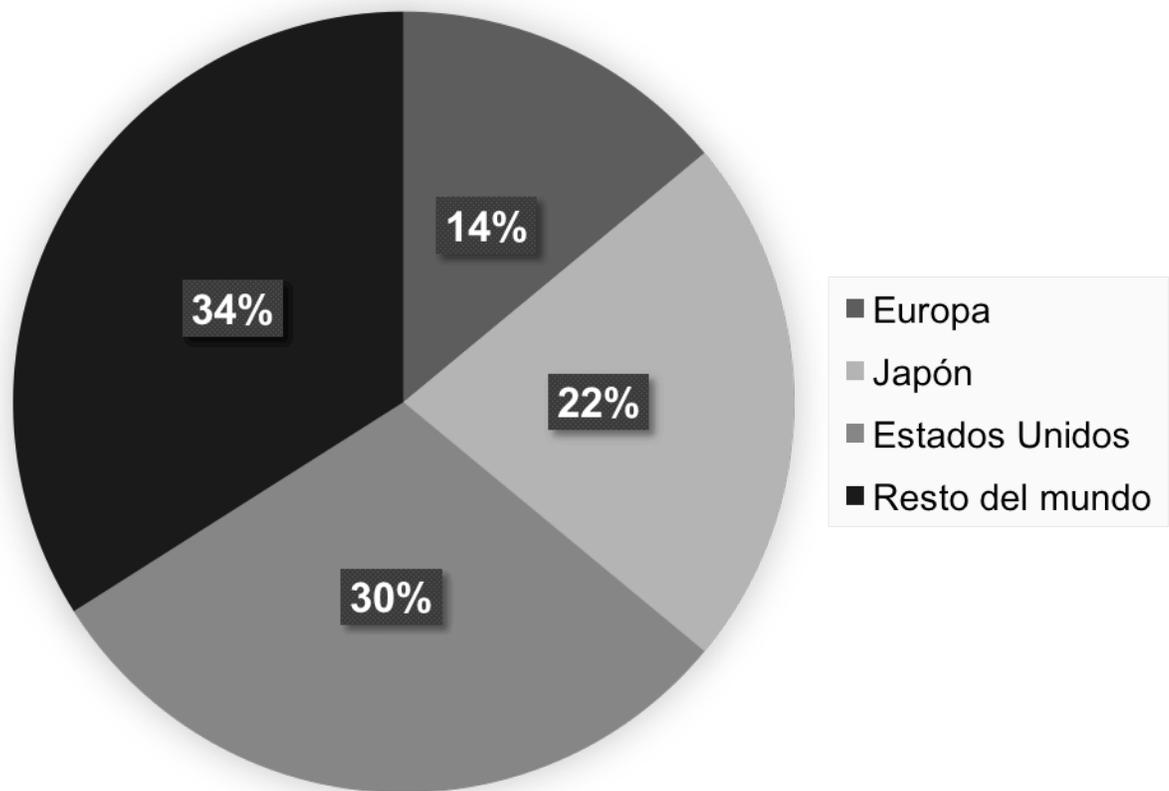


Fig 7. Principales países en el mercado mundial de los alimentos funcionales.

Adaptado de Euromonitor (2013).

Cuadro 7. Alimentos funcionales actualmente en el mercado de Estados Unidos¹

Alimento funcional	Componente bioactivo	Beneficio a la salud	Tipo de evidencia
Margarinas fortificadas	Ésteres de estanol y esteroles vegetales	Reduce el colesterol total y el LDL	Pruebas clínicas
Soya	Proteína	Reduce el colesterol total y el LDL	Pruebas clínicas
Producto de avena	β-Glucanos	Reduce el colesterol total y el LDL	Pruebas clínicas
Jugo de arándano	Proantocianidinas	Reduce las infecciones del tracto urinario	Pequeño número de pruebas clínicas
Aceite de pescado	(n-3) Ácidos grasos	Reduce los triglicéridos,	Pruebas clínicas y estudios epidemiológicos
Ajo	Compuestos Organosulfurados	Reduce el colesterol total y el LDL	Pruebas clínicas
Té verde	Catequinas	Reduce el riesgo de ciertos tipos de cáncer	Estudios epidemiológicos
Espinacas, col verde	Luteína/Zeaxantina	Reducir el riesgo de la degeneración relacionada con la edad	Estudios epidemiológicos
Tomates y productos procesados de tomate	Lycopeno	Reduce el riesgo de cáncer de próstata	Estudios epidemiológicos
Vegetales	Glucosinolatos	Reduce el riesgo de ciertos tipos de cáncer	Estudios epidemiológicos
Productos lácteos fermentados	Probióticos	Ayudan en la salud gastrointestinal	Estudios In vivo e In vitro, datos clínicos limitados

¹Alimentos aprobados por la FDA (ésteres de esteroles/estanol, avena, soya) generalmente son apoyados por un gran cantidad de ensayos clínicos. Tomado de Hasler (2002).

nutracéuticos. Esta tendencia de incorporar alimentos nutracéuticos en la industria, ha ido en incremento a través de los años como se puede observar en la siguiente **Fig 8** (Bourned Partners, 2013).

Estudios demuestran que los consumidores más probables, que muestran mayor interés en comprar un alimento funcional son las mujeres, esto es debido al papel que desempeñan como la persona responsable de la compra de alimentos en el hogar. En general, las mujeres han demostrado ser más reflexivas acerca de los problemas de alimentación y salud, en comparación con los hombres que tienen más confianza y muestran una visión bastante crítica y tradicional de comer (Teratanavat Hooker, 2006; Siró y col, 2008). Además, en estudios realizados han encontrado que es un factor clave el desarrollo socio-demográfico en la venta de alimentos funcionales, debido a que se ha identificado que un consumidor típico de alimentos funcionales es una mujer que sea culta, de una clase de ingresos alta y de una edad mayor a 55 años; ya que los grupos socioeconómicos más altos tiene una mayor disposición o capacidad para pagar un sobreprecio en este tipo de alimentos, también tiene un mejor conocimiento y una mayor conciencia al momento de elegir sus alimentos (Hilliam, 1996).

2 Propiedades nutracéuticas en los alimentos

Los compuestos nutracéuticos se clasifican de acuerdo a las propiedades de actividad biológica que presentan, lo cual está directamente relacionado principalmente con su estructura química en compuestos fenólicos y compuestos antioxidantes, dentro de estos se encuentran los ácidos grasos, pigmentos, polisacáridos (Hernández-Brenes y Serna-Saldívar 2003; Biruete y

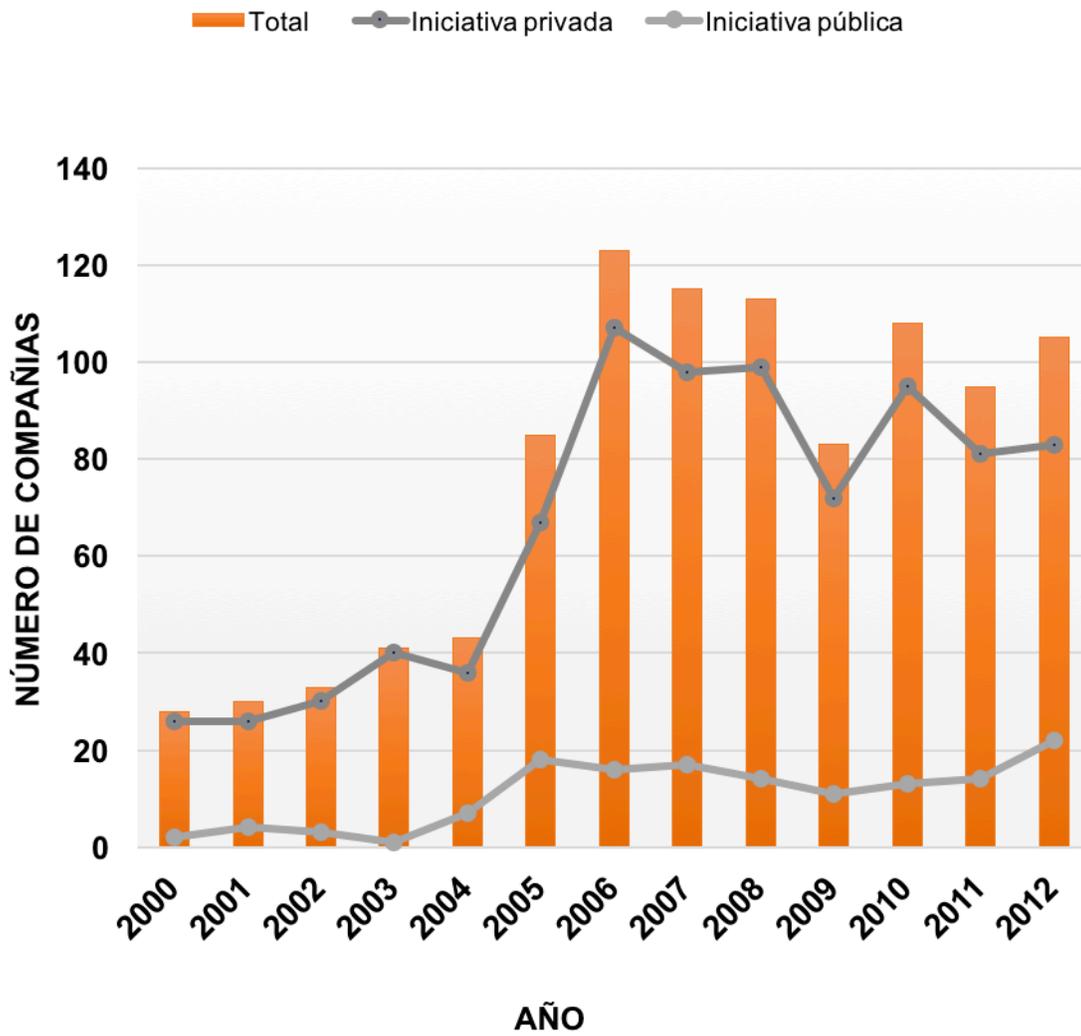


Fig 8. Desarrollo de la industria nutracéutica a través de los años. Adaptado de Bourned Partners (2013).

col 2009).

a Contenido de fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenólicos son metabolitos secundarios, con diferentes actividades, que van desde funciones de reproducción y crecimiento, actúan como mecanismo de defensa contra patógenos, parásitos y depredadores, contribuyen al color de las plantas, así como también en la salud humana están asociado con la reducción al riesgo de enfermedades crónicas, presentan actividad antioxidante y protección contra la radiación ultravioleta (Walter y Marchesan, 2011).

Los fenólicos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o mas grupos hidroxilos unidos (Machu y col, 2015). Se han reportado alrededor de 8,000 estructuras de compuestos fenólicos y se encuentran ampliamente dispersos por todo el reino plantae, y son considerados una de las clases mas importantes de antioxidantes naturales (Pierpoint, 2000; Machu y col, 2015). El rango de fenólicos se clasifican de acuerdo: simples de bajo peso molecular y compuestos de un solo anillo aromático; ó complejos, taninos y derivados de polifenoles (Pierpoint, 2000).

Estos pueden ser clasificados basados en el número de átomos de carbono y son comúnmente encontrados unidos a ácidos orgánicos y azúcares. Dentro de esta gran familia pueden encontrarse dos grupos principales: los flavonoides y los no flavonoides (Ochoa y Ayala, 2004). Dentro de los flavonoides se encontrarán los flavonoles, flavonas, flavanal-3-ol, antocianidinas, flavononas e isoflavonas, este grupo son los más numerosos de los fenólicos y se encuentra en grandes concentraciones en la piel de frutas. En cuanto al grupo de los no

flavoides se encuentran los ácidos fenólicos, hidroxicinamatos y estilbenos, de este grupo los que tiene mayor importancia en la dieta son los ácidos fenólicos destacando el ácido gálico (Croizer y col, 2006). Polifenoles han sido mayormente encontrados en frutas y bebidas, tales como té, vinos, y café, también en vegetales, leguminosas y cereales (Machu y col, 2015).

En investigaciones donde han evaluado el contenido de sustancias fenólicas en microalgas se ha encontrado que son bajos en comparación a las plantas terrestres; sin embargo, es necesario evaluar el perfil de estos compuestos para conocer el tipo de compuestos fenólicos que están presentes y saber si son diferentes a los que presentan las plantas terrestres (López y col, 2011; Goiris y col, 2012; Ismaiel y col, 2014; Saranya y col, 2014). Además, se sabe que el contenido de fenólicos puede incrementar mediante la manipulación de las condiciones medioambientales (Spolaore y col, 2006).

Se ha reportado que los compuestos fenólicos en microalgas forman parte de los componentes estructurales en las paredes celulares (Balboa y col, 2013). Se ha encontrado que estos compuestos presentan otras funciones biológicas, tales como protección contra la radiación ultravioleta, funciones reproductivas en la reproducción de las microalgas, mecanismo de protección frente a factores bióticos, así como también, propiedades terapéuticas, ya que presentan diferentes actividades como antioxidantes, antibacterial, antialérgicos, antiinflamatorias, antienvjecimiento, también se ha encontrado que pueden ayudar a la mejora de enfermedades como el cáncer, diabetes, y VIH (**ver Cuadro 8**) (Machu y col, 2015).

b Capacidad Antioxidante

La finalidad o mecanismo de los compuestos antioxidantes reside en su capacidad para captar los radicales libres que se pueden generar en las células del cuerpo humano y que son resultado de la combinación de muchos factores ambientales, incluida la contaminación atmosférica. Dichos radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón (e^-) desapareado en capacidad de aparearse, por lo que son muy reactivos. Estos radicales recorren nuestro organismo intentando robar un electrón de las moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido robar el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre, por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células (Loaiza-Nayar, 2010).

Las reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo y son necesarias para ciertos procesos fisiológicos, como el sistema de señales intracelulares, la inmunidad y la defensa contra microorganismos. Sin embargo, cuando existe un exceso de radicales libres puede inducir la apoptosis o daño celular, ya que los radicales libres pueden atacar lípidos (tanto ácidos grasos poliinsaturados de membrana como colesterol), proteínas y ADN (ácido desoxirribonucleico), ciertos tipos de hidratos de carbono, dando lugar a reacciones en cadena, en las que se generan nuevos radicales libres y toda una serie de nuevos compuestos, como carbonilos, aldehídos, entre otros (Pérez, 2007; Machu y col, 2015). Los radicales libres están íntimamente relacionados con la salud, ya que los compuestos generados en este proceso de oxidación de biomoléculas se han relacionado con una gran

Cuadro 8. Compuestos fenólicos extraídos de la biomasa de microalgas

Compuesto		Bioactividad
Polifenol	Florotaninos	Antioxidante
		Protección a la radiación
		Antiproliferativo
		Antibiótico
		Antidiabetes
		Anticáncer
		Anti-VIH
		Hepatoprotectivo
		Antialérgico
		Antibacterial
		Antiinflamatorio
		Previene contra enfermedades cardiovasculares
		Previene contra desordenes autoinmunes
Previene contra la artritis		
Fucol	Antioxidante	
Ergosterol	Antioxidante	

Adaptado de Guedes y col, (2014).

cantidad de enfermedades, fundamentalmente procesos degenerativos, como la enfermedad cardiovascular, ciertos tipos de cáncer (debido a las mutaciones que producen en el ADN ya que favorecen la proliferación celular al alterar factores de transcripción), patologías asociadas a un deterioro del sistema cognitivo, como el Alzheimer (Pérez, 2007).

Frente a las sustancias prooxidantes y sus efectos adversos, es necesario controlar el proceso de generación de radicales, el cuál debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante (Prior y col, 2005). Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, liberando electrones en nuestra sangre que son captados por los radicales libres convirtiéndose en moléculas inestables (Loaiza-Nayar, 2010). Diferentes investigaciones han demostrado la existencia de una correlación entre el consumo de una dieta rica en alimentos de origen vegetal con un menor riesgo de desarrollar ciertas enfermedades, como cardiovasculares, procesos inflamatorios, ciertos tipos de cáncer, entre otras (Chacón-Lee y González-Mariño, 2010; Guedes y col, 2014). Esto se ha relacionado con los compuestos bioactivos que presentan este tipo de alimentos, los cuáles pueden actuar como antioxidantes primarios, reaccionando directamente con los radicales libres, y dando lugar a un nuevo radical menos reactivo que el radical libre original (Pisoschi y col, 2009).

Diferentes métodos analíticos han sido utilizados para monitorear la capacidad antioxidante total de extractos de alimentos y plantas, por ejemplo algunos de los más utilizados son los métodos espectrofotométricos con DPPH[·](2,2-difenil-1-picril-hidrazila), ABTS⁺(2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-

sulfónico) o Fe^{3+} , ya que estos métodos se realizan de manera rápida, aunque mediante ellos solo se puede tener una idea de si el material presenta capacidad antioxidante; ya si se desea conocer que compuestos son los responsables de esa capacidad es necesario utilizar metodologías como el HPLC (High Performance Liquid Chromatography), las cuales nos permiten observar los compuesto que pudieran proporcionar la capacidad antioxidante al material de interés (Pisoschi y col, 2009).

Las microalgas son organismos fotosintéticos, que están expuestos a una combinación de luz y altas concentraciones de oxígeno, que inducen la formación de radicales libres y otros agentes oxidantes, por lo que la ausencia de daño estructural en ellos permite considerar que estos organismos son capaces de generar los compuestos necesarios para protegerse así mismos de la oxidación, por lo que respecto a eso pueden ser considerados como una importante fuente de compuestos antioxidantes que sirven de protección a nuestros cuerpos al presentarse las especies reactivas de oxígeno (ERO) formadas por nuestro metabolismo o inducidas por factores externos (como estrés, radiación UV, etc.), en las algas se pueden encontrar sustancias antioxidantes de diferente naturaleza, como vitaminas E (α -tocoferol) y C (ácido ascórbico), ácidos grasos y carotenoides los cuales están asociados a la fracción liposoluble, mientras que la mayor fuente de antioxidantes solubles en agua encontrados en algas son polifenoles y vitaminas (Ikeda y col, 2003; Pulz y Gross, 2004) (**Cuadro 9**).

3 Clasificación de los alimentos funcionales

Para la clasificación de los alimentos se han tomado diferentes características. Desde el punto de vista del producto Kotilainen y col (2006), Spence (2006) han propuesto la siguiente clasificación:

- Alimentos fortificados con nutrimentos adicionales, como algunos jugos de fruta fortificados con vitaminas como C y E, ácido fólico, algunos minerales como el zinc y calcio.
- Alimentos con nutrientes adicionales o componentes que normalmente no se encuentran en un producto en común; este tipo de alimentos es conocido como productos enriquecidos, ejemplo de este tipo de productos son los probióticos o prebióticos.
- Alimentos de los que un componente nocivo ha sido eliminado, reducido o sustituido por otro con efectos beneficios, a este tipo de alimentos se les denomina productos alternos, ejemplo de éstos son las fibras las cuales se han reconocido por su efecto para poder liberar la grasa en la carne o en helados.
- Alimentos en los que uno de sus componentes ha sido mejorado de forma natural, a éstos productos se les denomina productos mejorados, un ejemplo de este tipo de alimento es el huevo con aumento de su contenido de omega-3.

De acuerdo a una clasificación alternativa propuesta por Makinen-Aakula (2006), basada en el objetivo de los alimentos funcionales, éstos se pueden clasificar en:

- Alimentos funcionales que añaden valor a la vida, por ejemplo, un

Cuadro 9. Compuestos antioxidantes encontrados en microalgas

Compuesto		Bioactividad
Lípidos	Esteroles	Antiinflamatorio
	Ácido Eicosapentanoico	Antimicrobiano
		Antioxidante
	Ácido Linoleico	Antibacterial
	Fosfolípicos	Contribuye a la formación de lipoproteínas, conducción y protección del sistema nervioso, control muscular
Carotenoides	β -caroteno	Antioxidante
	Astaxantina	Antioxidante
	Cantaxantina	Antioxidante
	Violaxantina	Antioxidante
	Zeaxantina	Previene daños optalmologicos
	Luteína	Antioxidante
	Fucoxantina	Antiobesidad

Adaptado de Guedes y col (2014).

alimento que mejora las funciones del estómago y el colon (prebióticos y probióticos); mejoran la vida de los niños, apoyando su capacidad de aprendizaje.

- Alimentos funcionales que estén diseñados para reducir un problema de riesgo para la salud, tales como el colesterol alto o la presión arterial alta.
- Alimentos funcionales que faciliten la vida, por ejemplo, productos libre de lactosa o gluten.

Estudios recientes en el desarrollo de alimentos funcionales muestran que la atención de estos se centra en alimentos enriquecidos con diversos micronutrientes tales como el ácido graso omega-3, fitoesteroles y fibra soluble que promueven la buena salud o prevenir alguna enfermedad (Sloan, 2015). En el siguiente **Cuadro 10** se muestran los principales tipos de alimentos funcionales. El creciente interés en alimentos que proporcionen un valor agregado y bebidas con propiedades beneficiosas para la salud ha impulsado el desarrollo de nuevas bebidas elaboradas a base de diferentes tipos de aguas, jugos y bebidas no alcohólicas enriquecidos con frutas, como las fuentes naturales de nutrientes, colores y compuestos bioactivos (Gironés-Vilaplana y col, 2015). Así como también, otra razón de interés de los consumidores, que ha impulsado el desarrollo de éste tipo de alimentos es la intolerancia o alergia que algunas personas presentan hacia la ingesta de cierto tipo de alimento.

Entre las alergias o intolerancias más comunes que padece la población destacan, la lactosa, huevo, pescado, cacahuates, nueces, crustáceos, trigo, soya (Sloan, 2015).

Cuadro 10. Principales tipos de alimentos funcionales disponibles en el mercado

Tipo de alimento funcional y definición	Objetivo	Ejemplo
<p>Probióticos “Microorganismos vivos, que tras la ingestión de ciertos números, ejercen efectos positivos sobre la salud.</p>	<p>Influir en la salud humana a través de alteraciones en la microbiota intestinal</p>	<p>Bacterias ácido lácticas y bifidobacterias</p>
<p>Prebióticos Son ingredientes alimenticios fermentados no digeribles que permiten cambios específicos, tanto en la composición o actividad de la microflora gastrointestinal, beneficiando la salud del huésped</p>	<p>Para estimular el crecimiento o actividad de bacterias en el colon, prevención de la diarrea o estreñimiento</p>	<p>Fructo-oligosacáridos, isomalto-oligosacáridos, polidextrosa, lactulosa y almidón resistente</p>
<p>Cereales funcionales Son cereales que contiene fibra dietaria, sales como β-glucanos, oligosacáridos (galacto-, fructo-oligosacáridos) y almidón resistente</p>	<p>Sustratos fermentables por el crecimiento de microorganismos probióticos, fuentes de carbohidratos no digeribles</p>	<p>Avena, cebada, centeno</p>
<p>Bebidas funcionales Bebidas no alcohólicas fortificadas con vitaminas A, C y E, u otros ingredientes del tipo funcional</p>	<p>Para reducir los niveles de colesterol, estimular la función antioxidante y evitar la inhibición del crecimiento y deformación de los huesos</p>	<p>Bebidas reductores de colesterol (combinación de omega-3 y soya), bebidas para la salud ósea (con calcio), bebidas para la vista (con luteína)</p>

Adaptado de Cenci y Chingwaru (2010); Bigliardi y Galati (2013).

C BEBIDAS

1 Generalidades

Se definen como todos aquellos líquidos que ingieren los seres humanos, incluida el agua. Sin embargo, se excluyen productos líquidos para el reemplazo de comidas usados en el control de peso y las sopas. Se prescinde de estas últimas porque se comportan más como los alimentos sólidos que como líquidos, en términos de saciedad y compensación dietética (Rolls y Federoff 1990; Rolls y Bell 1999).

Una dieta saludable no requiere líquidos para satisfacer las necesidades de energía y nutrientes. Sin embargo, se han desarrollado diferentes tipos de bebidas con el fin de proporcionar cierta variedad y preferencias individuales a los consumidores, por lo tanto, una dieta saludable puede incluir diversos tipos de bebidas, además del agua. Otra razón que explica el desarrollo de estas recomendaciones de bebidas es la posibilidad de ayudar a los consumidores a elegir entre una variedad de bebidas saludables, con objeto de sustituir el patrón actual poco saludable de las bebidas que se consumen actualmente (Rivera y col, 2008).

Los requerimientos de líquidos varían en grado considerable entre los individuos y las poblaciones, es decir no será la misma cantidad de líquidos que ingiera una persona, la cual vive en una localidad donde la temperatura es alta a una que vive en una localidad con temperaturas bajas; así como también dependerá del contenido de alimentos consumidos en la dieta habitual y del gasto energético que realice el individuo (Rivera y col, 2008). Debido a esto no se ha logrado determinar un valor promedio para los requerimiento de agua; sin

embargo se ha establecido un volumen total de líquidos para hombres de 3.7 litros y mujeres 2.7 litros, basados en una ingesta total de líquidos por día. El balance entre la energía y contenido de nutrientes es de suma importancia para definir el papel de las bebidas en una dieta sana (IM, 2004; Rivera y col, 2008).

Existen diferentes ideas sobre la clasificación de los diferentes sistemas de agrupación de bebidas, de acuerdo a Popkin y col (2006) las bebidas se pueden clasificar tomando en cuenta los siguientes criterios: Densidad energética (kcal/240 mL), densidad de nutrientes (contenido nutricional/240 mL), contribución al consumo total de energía y peso corporal, contribución a la ingestión diaria de nutrientes esenciales, y los efectos benéficos y adversos que presentan a la salud. En base a esto las bebidas fueron, clasificadas en seis niveles (**Cuadro 11**); desde las menos recomendadas (nivel 6), integradas por bebidas que deben consumirse en cantidades limitadas y no de forma recurrente, hasta las más recomendadas (nivel 1), que deben representar la principal fuente de líquidos (el agua).

2 Consumo

México es uno de los países que más consume bebidas no alcohólicas (refrescos, jugos, té, y bebidas con cafeína) en el mundo. De acuerdo con la agencia Euromonitor International (2013), los mexicanos se han convertido en uno de los mayores consumidores de refresco del mundo, con un promedio de 119 litros por persona al año, ubicándose en el tercer puesto del ranking mundial, detrás de Argentina y Chile. Sin embargo, los refrescos y las bebidas azucaradas a base de fruta no son las únicas bebidas con alto contenido calórico. Nuevas bebidas, con el mismo perfil se encuentran en el mercado

Cuadro 11. Clasificación de los diferentes sistemas de bebidas

Niveles	Tipos de bebidas	Ejemplos
1	Agua potable	Agua purificada
2	Leche baja en grasa (1%) y sin grasa: bebidas sin azúcar adicionada	Yogures líquidos, leche de soya fortificada
3	Café y Té sin azúcar	Tés negro, verde, café y productos con cafeína
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 fruta, leche entera, bebidas para deportistas, bebidas alcohólicas, 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

Adaptado de Rivera y col (2008).

actual, algunos ejemplos de estas son los popularmente conocidos como “smoothies” o “batidos” (Rivera y col, 2008). De acuerdo a una encuesta nacional en vivienda de Parametría (2012), el 78% de la población admite consumir bebidas no alcohólicas, carbonatadas y endulzadas; de aquellos que las consumen 31% las toma uno o dos días a la semana, 29% las ingiere a diario, 22% afirma beberlas tres o cuatro días de la semana, 10% compra este tipo de líquidos de vez en cuando, y 7% ingiere bebidas dulces con gas casi todos los días.

En México, cerca de una cuarta parte de las calorías consumidas provienen de las bebidas. La Secretaría de Salud ha señalado que el alto consumo de energía a través de las bebidas es una de las causas principales de la epidemia de sobrepeso y obesidad. La falta de acceso al agua potable gratuita en escuelas y espacios públicos ha sido el mecanismo más efectivo de promoción del consumo de bebidas altas en calorías (Oxfam, 2013).

Alrededor del 50% de los aperitivos incluyen alimentos y bebidas, de los cuales el 17% representa el consumo de bebidas y el 38% representa el consumo de alimentos sólidos en aperitivos. Siendo las bebidas azucaradas, café, té, y jugos las bebidas más consumidas en aperitivos; alrededor del 41% de los consumidores ocasionalmente compran licuados como aperitivo (Sloan, 2015). De los sabores de bebidas más populares destacan el coco, mango, canela, jengibre, mora y mandarina (Jacobsen, 2015). Las bebidas de aranciata y limonata (bebidas de naranja y limón italiano, respectivamente) se han vuelto muy populares en restaurantes (Sloan, 2015). Bebidas a base de leche/ bebidas

alternativas son la categoría de desarrollo de nuevas bebidas, seguido de las bebidas energéticas/ deportivas, y el café/ el té (Jacobsen, 2015).

La prevalencia de sobrepeso y obesidad en los últimos 40-50 años ha incrementado drásticamente (Olsen y Heitmann, 2008). El consumo de bebidas azucaradas en países Europeos y de Estados Unidos ha ido incrementando, y ha mostrado que el 80% del aumento en el consumo de edulcorantes calóricos se debe al consumo de bebidas azucaradas (Popkin y Nielsen, 2003).

Una gran cantidad de estudios han evaluado la relación entre el consumo de bebidas azucaradas y los cambios que provocan en el peso, sugieren que un alto consumo de bebidas azucaradas calóricas aumentan el riesgo de padecer obesidad (Olsen y Heitmann, 2008; Vasanti y Frank, 2011). Una alternativa a esta problemática es el desarrollar bebidas que contribuyan a la salud y nutrición, todo lo contrario, al mercado de bebidas actuales que en lugar de presentar un efecto positivo a la salud aumentan la posibilidad de contraer una enfermedad (Gruenwald, 2009). Además, debido al aumento de las enfermedades crónico degenerativas, las cuales se han convertido en uno de los principales problemas de salud en los países desarrollados. Lo anterior ha provocado un aumento del interés por investigar posibles factores preventivos de estos procesos (Pérez, 2007). Por estas razones hoy en día la sociedad ha mostrado una tendencia hacia el consumismo verde, el cuál se enfoca hacia los productos naturales y orgánicos, donde el uso de aditivos sintéticos es limitado (Corbo y col, 2014).

3 Bebidas funcionales

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. Actualmente existen en el mercado bebidas energéticas (con sales y minerales, isotónicas, fibra y soya) y enriquecidas (vitaminas, oligosacáridos, β -caroteno), tés listos para beber y aguas de frutas, las cuáles se han vuelto populares en los jóvenes (Shahidi y Weerassinghe, 2004; Corbo y col, 2014). Un ejemplo de bebidas funcionales son el café, té y bebidas a base de cocoa, ingredientes que se ha encontrado que contiene una capacidad antioxidante elevada proveniente de polifenoles (Richelle y col, 2001).

La salud es factor importante para selección de un aperitivo para el 50% de los adultos (Sloan, 2015). Debido a esto, los últimos adelantos en bebidas están centrados en las áreas asociadas a la salud así como a la cosmetología e imagen, con el desarrollo de productos para el control del peso, el desarrollo de masa muscular, la reducción de grasa corporal, la prevención y combate de caries, e inclusive la belleza de la piel y el cabello (Sepúlveda, 2013). Tanto la conveniencia y la salud han sido identificados como factores clave en la toma de decisiones de los consumidores sobre la compra de alimentos y bebidas, lo cuál genera la demanda de este tipo de productos (ADA, 2008). Según un informe de Packaged Facts (2011), el último estudio de investigación internacional de BENEIO sobre bebidas funcionales, demuestra que los consumidores, esperan que las bebidas funcionales les suministren energía duradera y equilibrada además de mejorar su rendimiento mental. Las nuevas formas de suministro de energía y potenciación del rendimiento mental son la clave para el futuro de las bebidas funcionales (Torres, 2011).

El desarrollo de bebidas funcionales es considerado una oportunidad de negocio que cubre un nicho de mercado que es, aquel generado por una mejor apreciación por los efectos beneficios de los nutrientes y otros componentes en la dieta (Sepúlveda, 2013), el cuál ha impulsado el diseño de alimentos más saludables capaces de influir en las funciones corporales, además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas, sobre la base de mantener una buena salud y reducir el riesgo de padecer enfermedades. Las bebidas 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. El uso de las microalgas como ingredientes en las formulaciones de alimentos y bebidas saludables ofrece posibilidades interesantes (Gruenwald, 2009). Con base en esto la incorporación de microalgas en algunos alimentos y bebidas presenta una buena oportunidad para popularizar los beneficios en la salud de las microalgas entre los consumidores, incluso quienes no están acostumbrados a este alimento. Como resultado, en los últimos años han incorporado las microalgas en diferentes bebidas (**Cuadro 12**). Para esta industria las microalgas ofrecen la oportunidad de lograr la diversificación de productos y la participación de una posición en los mercados emergentes con un futuro muy prometedor (Cofrades, 2013).

Cuadro 12. Microalgas usadas como ingrediente en la elaboración de bebidas del tipo funcional

Microalga	Parámetros usados para evaluar el efecto de la incorporación
<i>U. pinnatifida</i>	Composición nutrimental Características sensoriales
<i>Hizikia fusiforme</i>	Composición nutrimental Características sensoriales
<i>Laminaria japonica</i>	Composición nutrimental Características sensoriales
<i>U. pinnatifida</i>	Actividad antioxidante Antihipertensiva
<i>Ecklonia cava</i>	Actividad antioxidante Antihipertensiva
<i>Hizikia fusiforme</i>	Actividad antioxidante Antihipertensiva
<i>Ulva pertusa</i>	Actividad antioxidante Antihipertensiva
<i>Hizikia fusiforme</i>	Actividad antihipertensiva
<i>Chllorella</i>	Propiedades funcionales Potencial a la salud
<i>Gracilaria fisheri</i>	Propiedades probióticas Contenido de minerales Características sensoriales

Tomado de Cofrades (2013).

IV JUSTIFICACIÓN

Debido al creciente interés y a la preocupación por desarrollar alimentos que ofrezcan un beneficio a la salud más allá de la nutrición básica; el aprovechamiento integral de la biomasa residual en el desarrollo de este tipo de alimento, representa una opción promisoría, al ser buena fuente de compuesto de alto valor mismos que se han asociado a la prevención y/o tratamiento de enfermedades del tipo crónico-degenerativas.

V HIPÓTESIS

Aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta como técnica de optimización es posible desarrollar bebidas funcionales con buenas propiedades nutrimentales y nutracéuticas, a partir de la biomasa residual de la microalga *Dunaliella tertiolecta*.

VI OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una bebida funcional con buenas propiedades nutrimentales y nutracéuticas, a partir de la biomasa residual de la microalga *Dunaliella tertiolecta*.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Obtener la biomasa de la microalga *Dunaliella tertiolecta*.
- 2 Caracterizar proximal, fisicoquímicamente y nutracéuticamente la biomasa residual de la microalga en estudio.
- 3 Obtener una formulación óptima a base de biomasa residual y saborizante para producir una bebida funcional con capacidad antioxidante alta mediante metodología de superficie de respuesta.
- 4 Evaluar el contenido nutrimental y energético de la bebida elaborada con la formulación optimizada.
- 5 Evaluar el potencial nutracéutico de la bebida elaborada con la formulación optimizada.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

1 Material Biológico

La cepa de la microalga a evaluar *Dunaliella tertiolecta*, se obtuvo de la colección de microalgas del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), La Paz, Baja California Sur, México.

B MÉTODOS

1 Cultivo de microalgas

Para el crecimiento de la microalga se empleó la técnica de transferencias sucesivas, la cuál se muestra en la **Fig 9**; hasta alcanzar un volumen de operación aproximado de 16 (L), los experimentos se mantuvieron bajo condiciones de luz, temperatura y aireación constantes, la temperatura se mantuvo en $24 \pm 2^\circ\text{C}$, empleando un equipo de refrigeración/calefacción. Se tuvo el cuidado de que todas las células se encontrarán expuestas a la misma cantidad de luz, la cual fue emitida a una intensidad de alrededor de 6,000-6,500 luxes, que es equivalente a un flujo de fotones de aproximadamente $130\text{-}210 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La aireación se suministró al cultivo de forma continua con un soplador de 2.5 hp de potencia. Se empleó el medio F/2 como fuente de nutrientes, el cual se preparó con la formulación propuesta por Guillard y Rhyter (1962), que se describe a continuación: sal de mar al 34%, enriquecida con los siguientes nutrientes (composición final por litro): 75 mg KNO₃; 5.65 mg NaH₂PO₄•2H₂O; 4.360 mg EDTA•Na₂; 3.150 mg FeCl₃•6H₂O; 0.010 mg CuSO₄•5H₂O; 0.022 mg ZnSO₄•7H₂O; 0.010 mg CoCl₂•6H₂O; 0.180

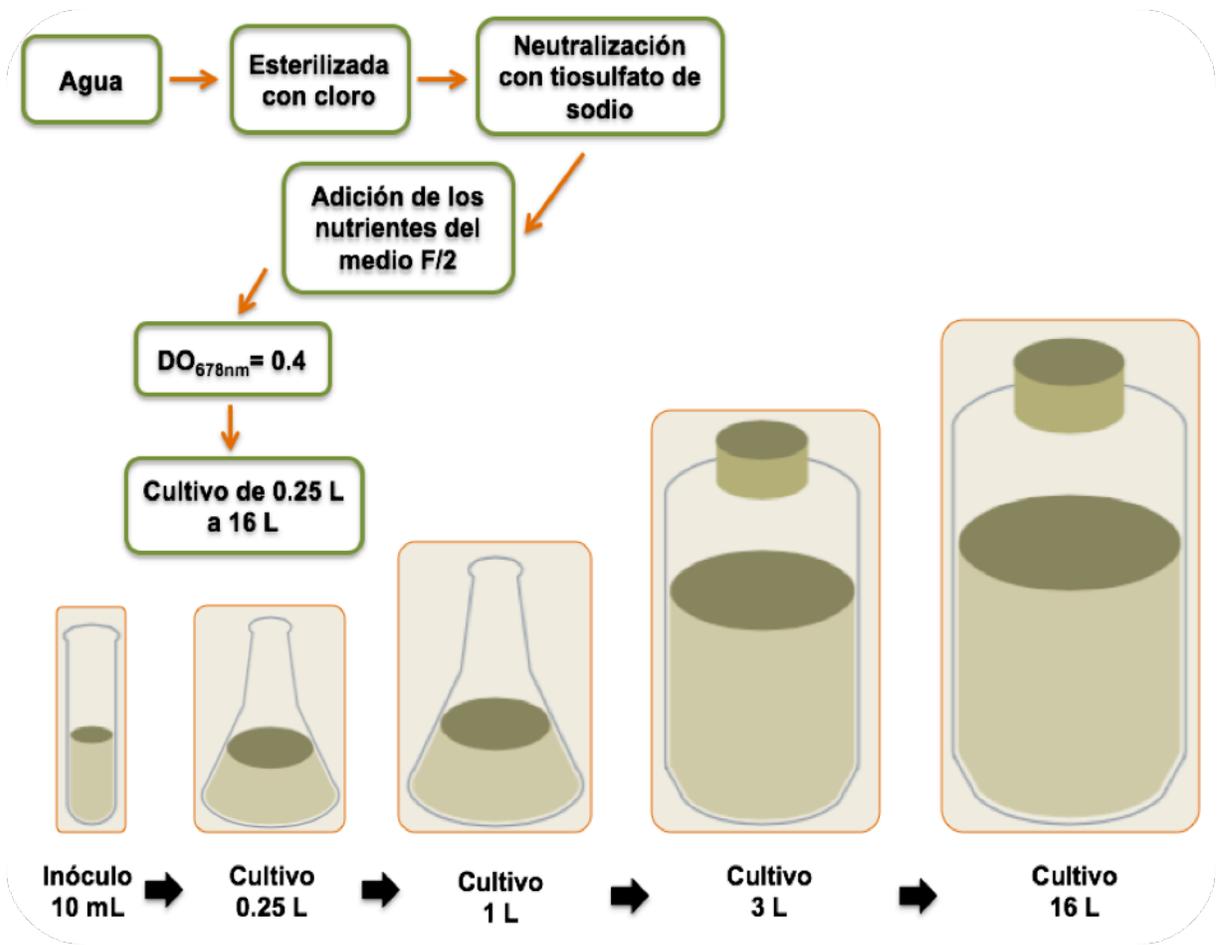


Fig 9. Diagrama general de producción de la microalga. Metodología transferencias sucesivas. Adaptado de Medina-Jasso y col (2012).

mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.006 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2 g cianocobalamina cristalina (B_{12}); 0.100 mg tiamina clorhídrica (B_1) y 0.001 mg biotina cristalina.

a Barrido de absorbancia máxima

Para la especie de microalga utilizada, se escaneó la longitud de onda a la cual presenta la máxima absorbancia, esto se realizó mediante un barrido entre 400 y 699 nm, utilizando un espectrofotómetro UV visible (BIOMATE 3 THERMO SCIENTIFIC). El valor de absorbancia máxima de la microalga se encontró a una longitud de onda de 678 nm, se utilizó para realizar la curva de crecimiento de densidad celular por densidad óptica (DO) (Ribeiro-Rodrigues y col, 2011).

2 Cinética de crecimiento

Para evaluar el crecimiento celular se utilizaron dos métodos analíticos: conteo celular y densidad óptica, de acuerdo a la metodología propuesta por Santos-Ballardo y col (2015b). Con base en los valores de conteo celular y densidad óptica, se calcularon los parámetros que describen la eficiencia del crecimiento celular (Tasa de crecimiento específico (μ), Tiempo de duplicación (t_d), utilizando las fórmulas propuestas por Godoy-Hernández y Vázquez-Flota (2006):

Tasa de crecimiento específico:

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

Tiempo de duplicación:

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

Siendo: μ , la tasa de crecimiento específico; t_d , el tiempo de duplicación; X_0 , la concentración de biomasa inicial, X la concentración de biomasa final y t el tiempo (días).

El conteo celular se realizó empleando un microscopio óptico compuesto (OLYMPUS CX21), un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y una cámara de 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 realizó una dilución, se multiplicó también por ésta (**Fig 10**); el valor resultante es el número de células por mililitro (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota, 2006).

La densidad celular del cultivo se midió mediante un método óptico de marco de lectura horizontal, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro UV-visible (BIOMATE 3 THERMO SCIENTIFIC), se tomaron 0.5 mL de muestra y se midió su absorbancia a 678 nm (longitud de onda a la cuál se obtiene la máxima absorbancia de la especie en estudio), se utilizó 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 celular presente y se ajustó con las mediciones de concentración celular realizada por otros métodos (Mikschofsky y col, 2009). Para ambas mediciones, se tomaron muestras cada 24 h. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. De esta forma, se verificó constantemente la viabilidad y estabilidad de todos los cultivos. Las curvas de crecimiento se construyeron de acuerdo a López-Elías y col (2013); a partir de ellas se determinó la densidad celular así como el

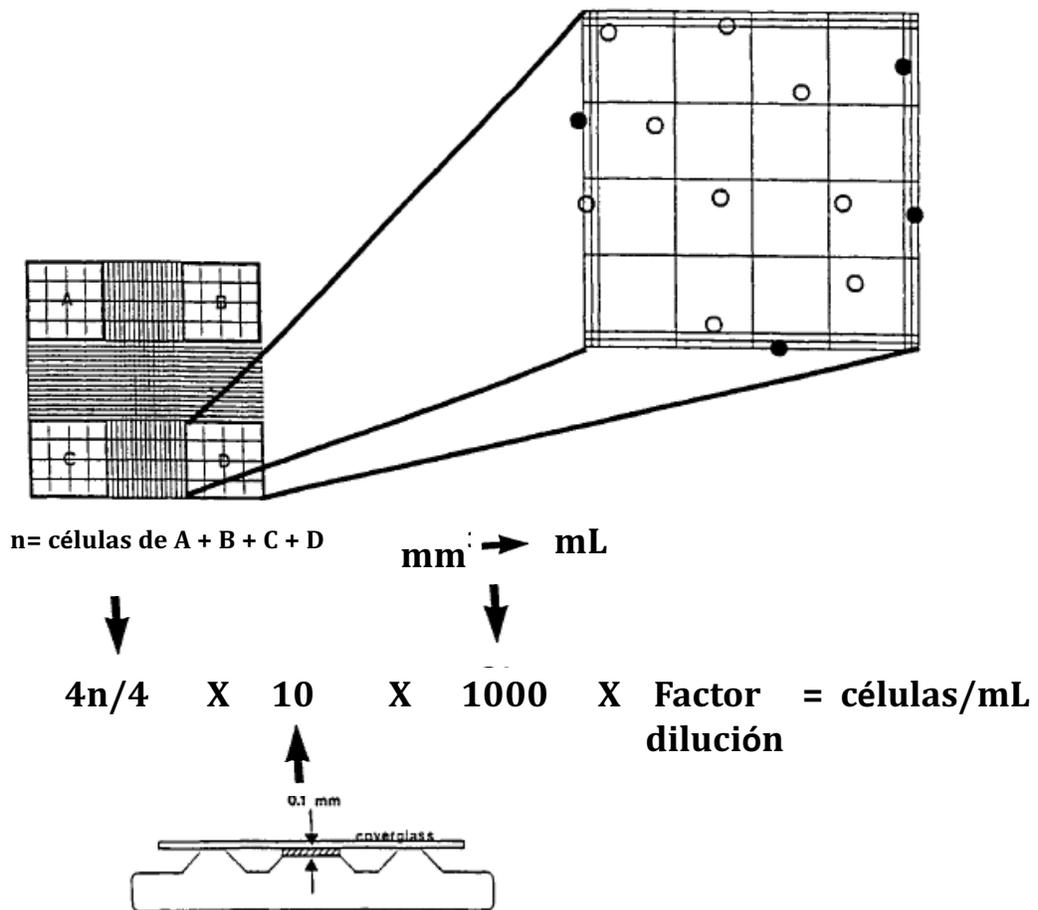


Fig 10. Calculo del número celular utilizando el hemocitómetro. Tanto para el conteo celular como para la determinación de viabilidad por colorante de exclusión, se cuentan todas las células dentro del área limitada por las líneas triples. Adaptada de Richardson y Fedorof (2001).

número de células por mililitro (cél/mL).

3 Obtención de la biomasa microalgal

La cosecha de la biomasa de microalgas se realizó cuando el cultivo se encontró en el máximo de la fase exponencial, misma que se detecta a través de las curvas de crecimiento. Las células se recolectaron una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica ($DO_{678\text{ nm}}$)= 0.4. La recuperación de las células de microalgas del medio de cultivo, se llevó a cabo mediante un proceso de floculación-sedimentación, empleando el floculante orgánico quitosano.

a Floculación

Con la finalidad de la utilización la biomasa de microalgas con un enfoque alimentario, se evaluó un floculante de carácter inorgánico para la separación de la misma del medio de cultivo el cuál sea amigable con el medio ambiente, de fácil manejo y no ser tóxico. El tipo de floculante utilizado fue quitosano ya que se caracteriza por ser presentar las características mencionadas.

La obtención de la biomasa por este método, permitió emplearla en la elaboración de un producto alimenticio, al no dejar partículas residuales, que pudieran afectar la salud, así como también evitar costos de depuración posteriores de la biomasa (Ahmad y col, 2011; Farid y col, 2013).

1) Evaluación de la eficiencia de floculación

Para determinar las mejores condiciones de floculación a utilizar para recolectar la biomasa de *Dunaliella tertiolecta* se evaluaron diferentes concentraciones de quitosano, diferentes tiempos de reposo, así como también se ajustó el pH en el medio cultivo de la microalga, según diagrama mostrado en la **Fig 11**; se midió la eficiencia de floculación a cada uno de los tratamientos

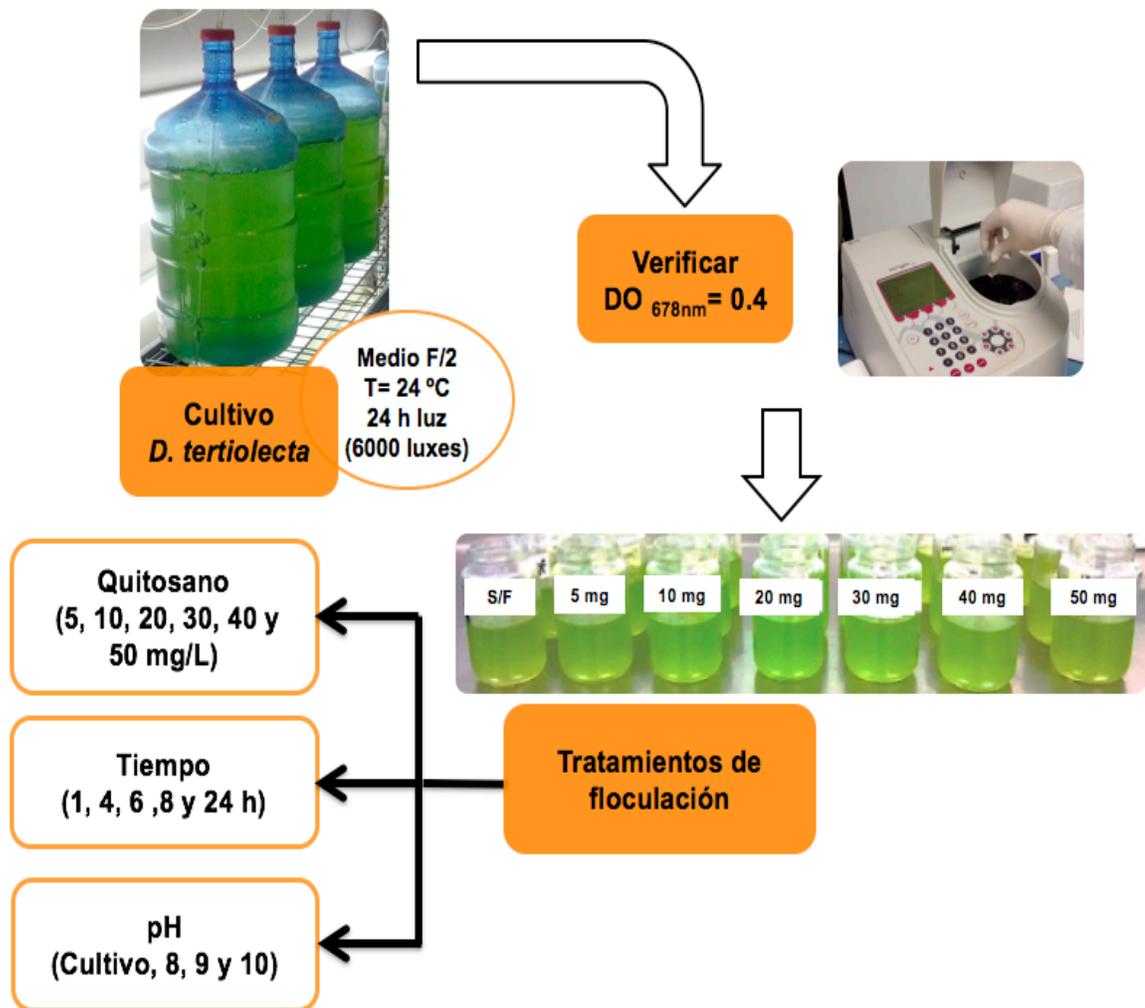


Fig 11. Proceso de floculación para la obtención de la biomasa de la microalga *D. tertiolecta*. Adaptado de Romero y Ferrán (2001); Salim y col (2011); Sirin y col (2012); Farid y col (2013).

obtenidos. Las mejores condiciones de floculación para la colecta de la biomasa microalgal correspondió al tratamiento que presentó la mayor eficiencia de floculación (Romero y Ferrán, 2001; Knuckey y col, 2006; Sirin y col, 2012). Cada uno de los experimentos para la determinación de la eficiencia de floculación, se realizaron por triplicado.

Las determinaciones de eficiencia de floculación se realizaron en 100 mL del cultivo de la microalga y frascos de cristal, que permitieran observar los cambios entre los distintos tratamientos. Se tomó una alícuota de 0.5 mL de muestra floculada y se midió su densidad óptica a una longitud de onda de 678 nm; en un espectrofotómetro UV-visible a los diferentes tiempos de floculación. Se utilizó como blanco el cultivo de la microalga al tiempo cero. La diferencia de densidad óptica se relacionó con la eficiencia del proceso de floculación, la cual se calculó mediante la siguiente fórmula propuesta por Farid y col (2013):

$$\% \text{ Eficiencia de Floculación} = \frac{DO_{678} (tf) - DO_{678} (ti)}{DO_{678} (ti)} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

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

b Proceso de extracción de aceite

El proceso de extracción de aceite de la biomasa microalgal, se llevó a cabo de acuerdo a la metodología de Bligh y Dyer (1959), y Soto-León y col (2014). La biomasa recuperada, se centrifugó (3500 g, 10 min), posteriormente se adicionaron 5 mL de la mezcla de solventes (cloroformo: metanol, relación 2:1) por cada g de muestra. Una vez agregados los solventes, la suspensión fue

sometida a irradiación ultrasónica a una temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por medio de un procesador ultrasónico por medio de un procesador ultrasónico de alta eficiencia (MICROSON XL2000, USA) con potencia de salida nominal de 100 W y cuyas vibraciones mecánicas se generan por medio de excitación electrónica a una frecuencia de 22.5 kHz. Para transmitir la potencia acústica al medio se utilizó un sonotrodo modelo P1, variándose la amplitud de 65-72% (Nivel 7-8), durante 3 h con ciclos de 15 min y 1 min de reposo. Lo anterior con la finalidad de tener una mayor ruptura celular y extracción de aceite. Posteriormente, se ajustó la proporción de solventes metanol/cloroformo/agua (2:1:0.8), se dejó en agitación por 30 min y, posteriormente, se separó la biomasa de los solventes mediante centrifugación (3500 g, 15 min).

Finalmente, la biomasa residual (BR), se secó en una estufa con aireación a 40°C , por 24 h y se realizó trituración manual para obtener la biomasa en polvo, la cual se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su posterior análisis.

4 Composición química, propiedades fisicoquímicas y nutraceuticas de la BR

a Composición química

1) Humedad

Se utilizó el método 925.09B 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 pesaron 3 g de muestra y se colocaron en una charola de aluminio en una estufa con circulación de aire forzado a 80°C por 24 h. La prueba se realizó por triplicado.

2) 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 se difirió con H₂SO₄ concentrado y para su destilación se utilizó NaOH 40% (p/v). El destilado se recolecto en una disolución de ácido bórico al 4%; se valoró con una solución de HCl 0.1 N. La prueba se realizó por triplicado.

3) Lípidos

Se determinó de acuerdo al método 920.39C de la AOAC (1999). Se pesaron 2.5 g de muestra y se realizó la extracción utilizando el equipo Saxtec System HT 1043 Extraction Unit (Tecator, Suecia); como disolvente se empleó hexano. La prueba se realizó por triplicado.

4) Fibra dietaria total

a) 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 (Sigma-Aldrich) y amiloglicosidasa (Sigma-Aldrich) para degradar las proteínas y almidón, respectivamente, presentes en la muestra. Para la precipitación de la fibra, se adicionaron cuatro volúmenes de etanol. El residuo total se filtró y lavó primeramente con etanol al 78%, seguido de etanol al 96% y, finalmente, con 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; peso de la muestra es el promedio de los pesos (mg) de la muestras crudas.

b) 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 secuencialmente 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.

El contenido de fibra soluble se calculó empleando la Ec. 4. La fibra dietaría total se determinó mediante la suma de la fibra insoluble más la fibra soluble.

5) Cenizas

Se utilizó el método 923.03 de AOAC (1999), 2 g de muestra se colocaron en un crisol de porcelana previamente pesado, y se sometió a incineración en una mufla a 550°C hasta que se obtuvo una ceniza gris; se llevó a temperatura ambiente en un desecador y se pesó. Enfriar en desecador y pesar. El porcentaje de cenizas se calculó a partir del cociente de la masa recuperada después de incineración y la masa inicial de la muestra en base seca, multiplicado por 100. La prueba se realizó por triplicado.

6) Carbohidratos

El porcentaje de carbohidratos se calculó por diferencia de 100, tomando

en consideración los porcentajes de humedad, proteína cruda, lípidos y cenizas.

b Propiedades fisicoquímicas

Se evaluaron algunas propiedades fisicoquímicas [pH, color, actividad de agua (a_w), índices de solubilidad y absorción de agua (ISA, IAA) e índice de dispersabilidad] a la biomasa residual de la microalga *Dunaliella tertiolecta*.

1) pH

Se determinó de acuerdo al método 981.12 de AOAC (1999), preparando una suspensión con 5 g de biomasa residual y 50 mL de agua destilada a 25°C, estéril, se agitó por 10 min a velocidad moderada. Posteriormente, en agitación se introdujo un electrodo para medir el pH. La determinación se realizó por triplicado.

2) Color

Se utilizó la metodología reportada por Reyes-Moreno y col (2003). El color de las muestras se determinó utilizando un colorímetro Minolta Chroma-meter modelo CR 210 (MINOLTA LTD, Japón). La determinación de color se basa en el efecto triestímulo, donde **L** mide la brillantez y varía de 100 para un blanco perfecto, a cero para negro. Las dimensiones de cromaticidad son dadas por los parámetros **a** y **b**. El valor positivo de **a** está asociado al color rojo y el negativo con el verde. El valor positivo **b** asociado al color amarillo y el negativo con el azul.

Para la evaluación del color se utilizaron aproximadamente 5 g de muestra, colocándola en una tapa de caja Petri de vidrio Kimas de 15 cm de diámetro, y se midieron los parámetros correspondientes **L**, **a** y **b**.

3) Actividad de agua (a_w)

Para su determinación se utilizó un equipo marca Aqualab modelo CX2 (Decagon Devices Inc, Pulman, WA, EUA). Se pesaron 2 g de muestra y se colocaron la muestra en la celda portamuestras del equipo hasta que alcanzó el equilibrio (40-60 min). Previamente, el equipo se calibró con una disolución saturada de cloruro de potasio ($a_w= 0.876$).

Las mediciones se realizaron por triplicado a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Milán-Carrillo y col, 2002).

4) Índice de solubilidad en agua y absorción de agua (ISA, IAA)

Se utilizó el método descrito por Anderson y col (1969). El IAA se calculó como gramos de gel formados por gramo de muestra seca después de la centrifugación (3000 x g/ 30°C/ 10 min) de una suspensión de biomasa (2.5 g de harina/ 30 mL de agua).

El ISA se evaluó pesando los sólidos obtenidos después de evaporar en una estufa el sobrenadante de la muestras. El ISA, se expresó como el porcentaje de sólidos secos en 2.5 g de muestra. Las pruebas se realizaron por triplicado.

5) Índice de dispersabilidad

Se usó la técnica reportada por Mora-Escobedo y col (1994). Se pesó 1 g de biomasa, la cual, se suspendió en 10 mL de agua destilada en un tubo cónico graduado. Las muestras se homogenizaron en un Ultra Turrax (10,000 rpm x 5 min). La separación de las fases se midió después de 30 min de reposo. Para calcular el porcentaje de dispersabilidad se dividió la diferencia entre el volumen inicial (tiempo 0) y el volumen de separación de las fases (después de 30 min)

entre el volumen inicial; después dicho cociente se multiplicó por 100. La prueba se realizó por triplicado.

c Propiedades nutracéuticas

1) Obtención de los extractos fitoquímicos libres

Se utilizó el procedimiento descrito por Adom y Liu (2002) para la obtención de los extractos hidrofílicos libres, tanto etanólicos, como metanólicos (**Fig 12**).

a) Extractos etanólicos y metanólicos

Los fitoquímicos libres etanólicos y metanólicos, se extrajeron a partir de 0.25 g de biomasa residual de la microalga en estudio, adicionando 5 mL de etanol al 80% (v/v) y metanol 80% (v/v), respectivamente. La mezcla se agitó en un rotator (OVAN NORIA R, EUA, 2010) a velocidad de 25 RPM/10 min, se centrifugó a $3,000 \times g$ / 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 la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos. Los precipitados provenientes de cada fracción se guardaron para la posterior obtención de los extractos de fitoquímicos ligados, la extracción se realizó por cuadruplicado.

2) Obtención de los extractos fitoquímicos ligados

Se empleó el método de Adom y Liu (2002), con las modificaciones reportadas por Mora-Rochín y col (2010) para la obtención de los fitoquímicos ligados (**Fig 12**).

a) Extractos etanólicos y metanólicos

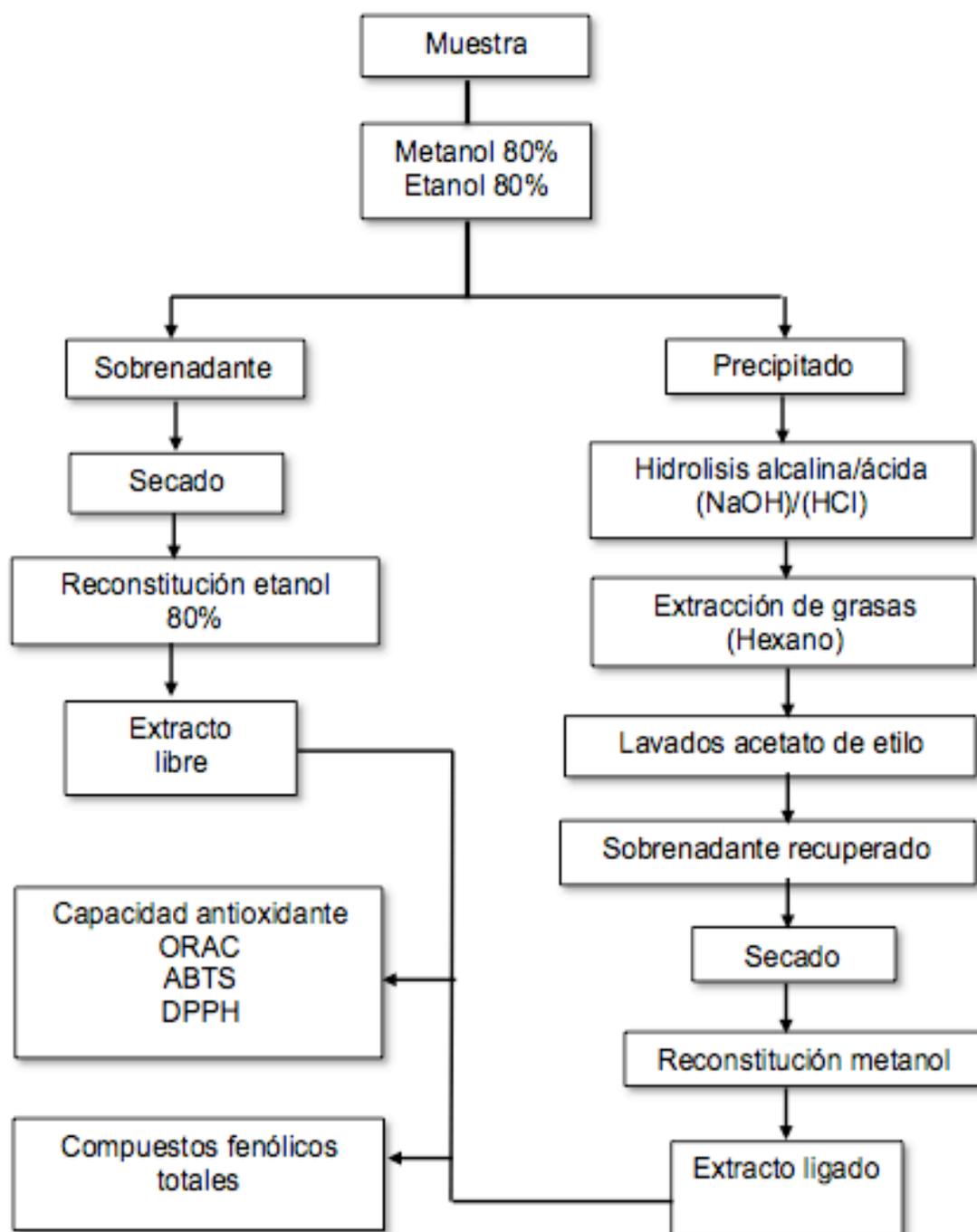


Fig 12. Diagrama de flujo para la obtención de fitoquímicos libres y ligados, metanólicos y etanólicos para la determinación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. Adaptado de Adom y Liu (2002).

Los precipitados provenientes de la extracción de fitoquímicos libres, tanto etanólicos como metanólicos, se digirieron 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 agitaron 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 vórtex y posteriormente en un rotator (OVAN NORIA R, EUA, 2010) a velocidad de 25 RPM/10 min, se agregaron 5 mL de hexano; se repitió la misma operación de agitación y se centrifugó a 3000 x g/ 10°C por 10 min, se extrajo con 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). Los extractos provenientes de cada fracción se reconstituyeron con metanol y se almacenaron a 4°C hasta su posterior utilización en la determinación del contenido de fitoquímicos y la capacidad antioxidante correspondiente a fitoquímicos ligados.

3) Determinación del contenido de fitoquímicos

a) 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. En una placa de 96 pozos, se adicionaron 20 µL de cada extracto los cuales se oxidaron con 180 µL del reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 3 min de reposo, se adicionaron 50 µL de carbonato de sodio al 7%, y se llevó a incubación a temperatura ambiente. 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 preparó 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), por 100 g de muestra, en base seca.

4) Determinación de la capacidad antioxidante

a) Método ORAC

La medición de la capacidad antioxidante se llevó a cabo por el método de capacidad de absorbancia de radicales oxígeno (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC), para compuestos hidrofílicos tanto etanólicos como metanólicos (Cao y col, 1995; Ou y col, 2001; Wu y col, 2004). La degradación del compuesto 2-2'-Azobis amidinopropano (AAPH) produce radicales peróxido (ROO^\cdot), los cuales oxidan al compuesto fluorescente diclorofluoresceína (DCFH) al compuesto no fluorescente, diclorofluorescina (DCF). La capacidad 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 una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4).

La fluoresceína se preparó a una concentración de 0.1 mM con solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4). Para la medición se diluyeron los extractos de fitoquímicos libres y ligados usando solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4), se depositaron 25 μL de AAPH por medio del autodispensador del equipo previamente programado. Las muestras y el control se analizaron por cuadruplicado. La reacción se llevó a 37°C y la fluorescencia se midió a 485 nm

de excitación y 538 nm de emisión, por un lapso de 40 min, la reacción con los radicales piróxilos generó la pérdida de la fluorescencia con el tiempo.

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

b) Método ABTS

La capacidad antioxidante de los extractos etanólicos y metanólicos de fitoquímicos libres y ligados de las muestras, se estimó también en términos de la actividad captadora de radicales libres mediante el ensayo de decoloración del catión radical ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) 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 madre del catión radical ABTS** se diluyó en solución amortiguadora de fosfatos 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 inició cuando se adicionaron 1980 μL de la solución ABTS**. Se registró la absorbancia, a 734 nm, 15 min después

de haber iniciado el ensayo y se calculó la pérdida de absorbancia del ABTS** respecto al blanco. Se utilizó una curva de calibración con Trólox y los datos se expresaron como μmol equivalentes de Trólox por 100 g de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET/ 100 g, bs}$).

c) Método DPPH

Se determinó utilizando la metodología descrita por Brand-Williams y col (1995), con las modificaciones descritas por Fukumoto y Mazza (2000) para el empleo de microplaca de 96 pozos. Se partió de una solución DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) ($609 \mu\text{M}$) disuelta en metanol absoluto, de la cual, se preparó una solución DPPH ($150 \mu\text{M}$) 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 microaplaca de 96 pozos, se inyectaron $22 \mu\text{L}$ de cada extracto, se mezclaron con $200 \mu\text{L}$ de la solución DPPH ($150 \mu\text{M}$). 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 Trólox (0 a $200 \mu\text{M}$); 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 micromoles equivalente de Trólox por 100 g de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET/ 100 g, bs}$).

5 Optimización de formulaciones a base de una mezcla de BR y saborizante para la preparación de una bebida funcional con capacidad antioxidante alta

a Diseño experimental

Para conocer la mejor combinación de las variables del proceso

(CBR= Concentración de Biomasa Residual, CS= Concentración de Saborizante) para la preparación de bebidas funcionales con capacidad antioxidante alta, se utilizó la metodología de superficie de respuesta (Montgomery, 1991). Se utilizó un diseño experimental central compuesto rotatable, utilizando como variables independientes las concentraciones de biomasa residual y saborizante (CBR, CS). Los niveles de variación de las variables fueron: CBR 0 – 9 g/300 mL de bebida y CS 0 – 3 g/300 mL de bebida. Como variable de respuesta se relacionó la capacidad antioxidante (Caox) evaluada experimentalmente.

El diseño experimental generó 11 tratamientos (**Cuadro 16**, Sección VIII,E) de los cuales, cuatro correspondieron a combinaciones factoriales, otros cuatro a combinaciones axiales de las variables de proceso y tres puntos centrales correspondientes a las réplicas del proceso.

b Obtención de las formulaciones de mezclas de BR y saborizante empleadas para elaborar las bebidas funcionales

A partir del diseño experimental se obtuvieron 11 formulaciones (**Cuadro 16**) de mezclas distintas de BR y saborizante de mango (Proteínas 3.17%, lípidos 0.11%, cenizas 4.22%, carbohidratos 92.49% y fibra dietaria total 7.23%). Se determinó la capacidad antioxidante de estas formulaciones por el método ABTS.

c Capacidad antioxidante de las formulaciones

1) Obtención de los extractos de fitoquímicos libres

Los extractos libres de las formulaciones arrojadas por el diseño experimental (**Cuadro 16**, Sección VIII,E), se obtuvieron a partir del procedimiento descrito en el apartado VII,B,4,c,1),a).

2) Obtención de los extractos de fitoquímico ligados

Los extractos ligados de las formulaciones arrojadas por el diseño experimental (**Cuadro 16**, Sección VIII,E) se obtuvieron a partir del procedimiento descrito en el apartado VII,B,4,c,2),a).

3) Determinación de la capacidad antioxidante (Caox) por ABTS

La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de cada una de las formulaciones (**Cuadro 16**, Sección VIII,E), se determinó utilizando el método ABTS descrito en el apartado VII,B,4,c,4),b).

d Análisis de varianza y regresión

El análisis de varianza y regresión se realizó a los valores experimentales obtenidos para la capacidad antioxidante (Caox) de las bebidas funcionales elaboradas con formulaciones a bases de una mezcla de biomasa residual y saborizante de acuerdo al diseño experimental central compuesto rotatable (**Cuadro 16**, Sección VIII,E) de la metodología de superficie de respuesta (MSR), con dos variables de proceso, seleccionadas para este estudio.

El modelo de la **Fig 13** muestra la relación entre las variables de proceso o independientes [X_1 = concentración de biomasa residual (9 g/300 mL de bebida), X_2 = concentración de saborizante (3 g/300 mL de bebida)] y la variable de respuesta o dependiente [capacidad antioxidante] mediante un polinomio de segundo orden. Se aplicó análisis de regresión a los valores de la variable de respuesta obtenidas experimentalmente, los términos no significativos ($p > 0.1$) se eliminaron y se recalculó un nuevo polinomio (modelo de predicción) para la variable de respuesta (Khuri y Comell, 1987). A partir del modelo de predicción se construyeron gráficas de superficie de respuesta y de contornos, para estudiar el efecto de las variables de proceso sobre la variable de respuesta analizada. El

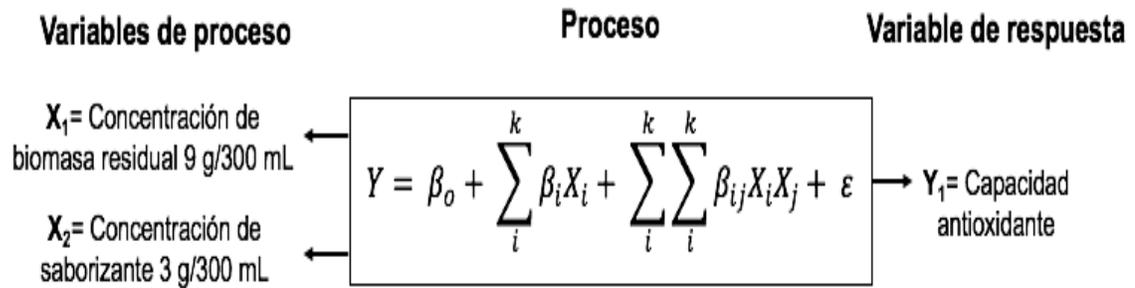


Fig 13. “Caja negra” del modelo matemático que muestra la relación entre las variables de proceso y la de respuesta de las formulaciones para la elaboración de bebidas funcionales a partir de biomasa residual y saborizante.

análisis de los datos y la obtención de las gráficas de superficie de respuesta y de contornos se hizo con la ayuda del software Design Expert versión 7.0.0.

e Optimización

Para determinar la mejor combinación de las variables de proceso se emplearon los gráficos de contornos y superficie construidos a partir del modelo experimental ajustado por regresión para la Caox. En la presente investigación se deseó que la variable de respuesta (Caox) alcanzara valores tan altos como fuera posible, para lograr obtener una combinación de CBR y CS donde se obtuviera la máxima capacidad antioxidante, con el objeto de obtener una bebida funcional con una capacidad antioxidante elevada.

6 Caracterización nutricional y nutracéutica de la formulación optimizada

a Composición química

Se determinó la composición química (Humedad, Proteína, Lípidos, Fibra dietaria total, fibra soluble e insoluble, cenizas y carbohidratos) de la formulación optima (**FO**) utilizando los procedimientos descritos en las secciones VII,B,4,a,1),2),3),4),a),b),5),6).

b Contenido energético

El contenido energético de la formulación 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 Propiedades nutracéuticas

1) Capacidad antioxidante

a) Obtención de los extractos fitoquímicos libres

Los extractos libres de la formulación óptima (**FO**) se obtuvieron utilizando el procedimiento descrito en el apartado VII,B,4,c,1),a) para extractos etanólicos.

b) Obtención de los extractos fitoquímicos ligados

Los extractos ligados de la formulación óptima (**FO**), se obtuvieron utilizando el procedimiento descrito en el apartado VII,B,4,c,2),a) para extractos etanólicos.

c) Determinación de la capacidad antioxidante por métodos ORAC, ABTS y DPPH

Se determinó la capacidad antioxidante de los extractos de la formulación óptima (**FO**) utilizando los métodos ORAC, ABTS y DPPH, descritos en el apartado VII,B,4,c,4),a),b),c).

2) Contenido de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos de la formulación óptima (**FO**) se determinó utilizando la metodología de Singleton y col (1999) descrita en el apartado VII,B,4,c,3),a).

7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de floculación para la obtención de biomasa microalgal se analizaron con un diseño experimental de dos factores, así como, los datos de capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos de la BR se analizaron con un diseño experimental unifactorial, utilizando el paquete estadístico Minitab 16. Se aplicó la prueba Tukey para analizar diferencias significativas entre medias de los distintos tratamientos ($p \leq 0.05$).

VIII RESULTADOS Y DISCUSIONES

A CINÉTICA DE CRECIMIENTO

En la **Fig 10** se observa la cinética de crecimiento de *D. tertiolecta*. En el presente trabajo, analizando las curvas de crecimiento desarrolladas por conteo celular y densidad óptica para la microalga en estudio, muestran un comportamiento sigmoideal típico del crecimiento celular microbiano (Doble y Gummadi, 2007). Al inicio del cultivo se obtuvo un conteo celular de alrededor de $2.68 \times 10^5 \pm 4.5 \times 10^4$ células por mL (cél/mL) y una $DO_{678 \text{ nm}}$ de 0.09 ± 0.01 , no se observó claramente una fase de latencia ya que se iniciaron los cultivos con un número elevado de cel/mL (268,333 cél/mL), prácticamente la cinética inicia en la fase exponencial; esta fase de crecimiento exponencial tuvo una duración cercana a los 4 d, en donde las células utilizan los nutrimentos de manera más eficiente y se alcanza una velocidad máxima de crecimiento, llegando al valor más alto al día 7 de cultivo con un conteo de $2.11 \times 10^6 \pm 1.0 \times 10^6$ cél/mL y una $DO_{678 \text{ nm}}$ de 0.51 ± 0.01 . Posteriormente se mantuvo una fase estacionaria donde progresivamente disminuyó el crecimiento debido a la disminución de los nutrientes presentes, la cual se mantuvo alrededor de 7 días. Finalmente, se alcanzó la fase de muerte celular como se observa en la **Fig 14**. A partir de las gráficas realizadas se obtuvieron los valores de la tasa de crecimiento específico (μ) = 0.27 d^{-1} y en base a esta, se obtuvo el tiempo de duplicación (t_d) = 2.59 d (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota, 2006).

Los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento para *D. tertiolecta* se encuentran dentro de lo reportado por investigadores, como de López-Elías y col (2013), quienes realizaron cinéticas de crecimiento *D. tertiolecta* alcanzando

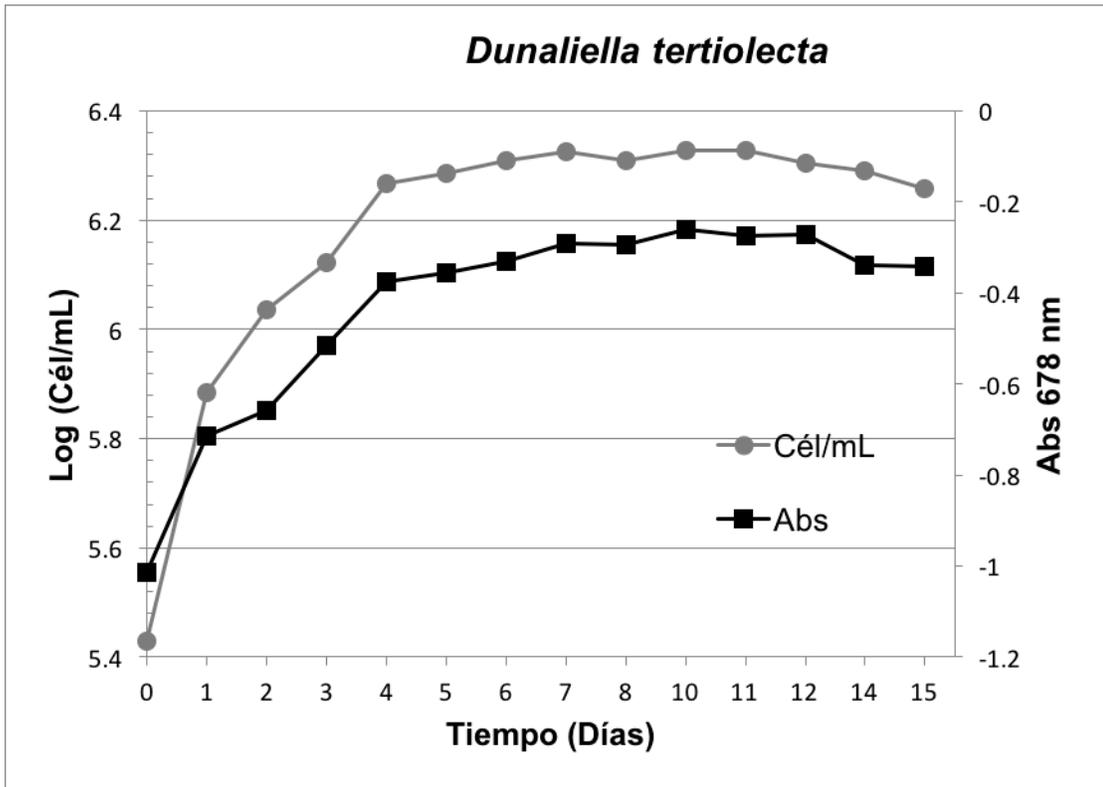


Fig 14. Cinética de crecimiento de *D. tertiolecta*, mostrando la relación entre el conteo celular y la densidad óptica.

la máxima densidad celular al día 6 con 1.28×10^6 cél/mL. Venkatesan y col (2013) evaluaron el crecimiento de *Dunaliella tertiolecta* en el medio De Walne's y otras condiciones de cultivo como luz/oscuridad encontrando la máxima densidad celular de 8.48×10^6 cél/mL. Santos-Ballardo y col (2015b) reportaron la máxima densidad celular para *Nannochloropsis gaditana* de 8.83×10^7 (cél/mL) y una DO_{682nm} 1.94; además, obtuvieron valores para la tasa de crecimiento específico y tiempo de duplicación de $(\mu) = 0.23 \text{ d}^{-1}$ y $(dt) = 3.03 \text{ d}$, respectivamente.

Al comparar los valores de las cinéticas de crecimiento de microalgas reportadas en la literatura por diferentes investigadores (Lopez-Elías y col, 2013; Venkatesan y col, 2013; Santos-Ballardo y col, 2015b), es posible observar comportamientos de crecimiento similares; sin embargo, 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 tipo de medio de cultivo, así como también la cantidad de inóculo utilizada, la agitación, y la edad de las células empleadas, los cuales afectan la duración de las fases de crecimiento celular, así como la biomasa total obtenida, mas no el comportamiento típico de crecimiento de las células (Castillo-Reyna, 2011; Santos-Ballardo y col, 2015b).

Las cinéticas de crecimiento, desarrolladas mediante los dos métodos, el conteo celular y la densidad óptica, muestran comportamientos de crecimiento

similares. Esto es de suma importancia, ya que permite relacionar el número de células con la densidad óptica, un método de conteo más rápido, simple y confiable, ya que la longitud de onda es específica para la microalga en estudio. Este comportamiento ha sido reportado por otros investigadores, en donde han relacionado el conteo celular y la densidad óptica de algunos pigmentos tales como clorofila *a*, *b*, *c* y algunos carotenoides presentes en las microalgas; así como también han correlacionado el conteo celular y la densidad óptica para obtener un método más práctico (Ebenezer y Ki, 2013; Lee y col, 2013b; Santos-Ballardo y col, 2015b).

B OBTENCIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL

1 Tratamientos de floculación

En el **Cuadro 13** se muestran los resultados experimentales de eficiencia de recuperación de biomasa residual de la microalga *D. tertiolecta* durante el proceso de floculación, empleando quitosano como floculante. Los tratamientos de floculación empleados (**Cuadro 13**) para este propósito correspondieron a combinaciones de diferentes niveles de las variables independientes pH, tiempo de reposo (*t*; min) y concentración de quitosano (CQ; mg), los cuales fueron utilizados para obtener el mejor tratamiento de floculación de la biomasa microalgal, correspondiente al mayor valor posible de eficiencia de floculación (%). A partir de los datos experimentales de eficiencia de floculación (%) mostrados en el **Cuadro 13**, se realizó un análisis de varianza, resultando significativo ($p < 0.05$) el efecto de las tres factores estudiados (pH, *t*, CQ). Posteriormente se realizó una comparación de medias por columnas y renglones utilizando la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para encontrar los mejores tratamientos

de floculación. Con base a este análisis estadístico se concluyó que los mejores tratamientos fueron a pH de cultivo de 6.4, concentración de quitosano de 10 mgL⁻¹ y a los tiempo de reposo de 4, 6, 8 y 24 min con eficiencias de floculación de 91.47, 91.47, 92.04 y 94.64%, respectivamente, sin presentar diferencias significativas ($P>0.05$) entre ellos; también, los tratamientos a pH de 9 y tiempo de reposo de 24 h a las concentraciones de quitosano de 30, 40 y 50 mgL⁻¹, presentaron buenos valores de eficiencia de floculación de 83.35, 85.21 y 90.97%, respectivamente, los cuáles no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre ellos. Asimismo, se realizó una comparación múltiple de medias, para encontrar el mejor tratamiento, aplicando la prueba de Tukey ($p\leq 0.05$), en el cuál se utilizó un HSD (Honestly Significant Difference) = 27.45, y se analizó con ayuda del software Minitab 16. El cuadro mostrando la comparación de medias no se muestra debido a su extensión, al ser una comparación de 120 medias. Con base a este análisis se obtuvo que el mejor tratamiento resultó a pH de cultivo de 6.4, un tiempo de reposo de 24 h, y concentración de quitosano de 10 mgL⁻¹, obteniendo una eficiencia de alrededor del 95%.

Los resultados anteriormente mencionados concuerdan con lo reportado por Farid y col (2013) quienes evaluarón la microalga *Nannachloropsis sp.* utilizando pH 7-9 y concentraciones de 20-120 mgL⁻¹, alcanzando eficiencias alrededor del 95%, dichos valores de eficiencia se evaluaron en un tiempo de reposo de 1 h. Ahmad y col (2011) evaluaron la adición de quitosano para colectar la microalga *Chlorella sp.* alcanzando eficiencias de floculación del 100%. Tuan y col (2009) evaluaron la microalga *Chaetoceros calcitrans* a diferentes concentraciones de quitosano encontrando porcentajes de eficiencia

del 80% a una concentración de 20 mg/L y a un pH de 7. Las diferencias podrían deberse a que la eficiencia de floculación depende en gran parte del tipo y tamaño de célula, de la concentración celular, las condiciones del medio y del tiempo de reposo (Ahmad y col, 2011; Garzón-Sanabria y col, 2012; Liu y col, 2014).

Durante los experimentos se obtuvieron eficiencias altas de floculación mediante la utilización de quitosano, lo cual podría deberse a la interacción de éste con las membranas celulares de las microalgas, posiblemente mediante la unión entre los grupos amino cargados positivamente del quitosano (NH_2^+) y los polisacáridos cargados negativamente en la superficie de las microalgas (Gualtieri y col, 1988). El quitosano se considera como un floculante orgánico efectivo en la cosecha de la biomasa de la microalga *D. tertiolecta*, por lo que presenta un gran potencial para ser escalado a nivel industrial ya que no requiere tratamientos de depuración posteriores (Ahmad y col, 2011; Sirin y col, 2012).

C COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LA BR

1 Composición química

En el **Cuadro 14** se muestra la composición química de la BR de la microalga *Dunaliella tertiolecta*. La BR presento 54.30% carbohidratos, 32.95% proteínas, 33.85% fibra dietaría (fibra soluble=1.07%, fibra insoluble= 32.77%), 12.38% cenizas y 0.36% lípidos. Los lípidos los cuales se encontraron en cantidades traza ya que la BR se obtiene como subproducto de la extracción de aceite para la producción de biodiesel. El bajo o nulo contenido de lípidos aquí reportado puede atribuirse a una eficiente metodología de extracción de aceite

Cuadro 14. Composición química y propiedades fisicoquímicas de la BR de la microalga *Dunaliella tertiolecta*

Propiedades	Biomasa residual
Composición química (% bs)	
Proteína	32.95 ± 0.85
Lípidos	0.36 ± 0.03
Cenizas	12.38 ± 0.01
Carbohidratos	54.30 ± 0.82
Fibra Dietaria Total	33.85 ± 0.45
Soluble	1.07 ± 0.03
Insoluble	32.77 ± 0.41
Fisicoquímicas	
Color	
Hunter "L"	24.63 ± 0.21
"a"	-0.29 ± 0.01
"b"	6.93 ± 0.08
a_w	0.31 ± 0.01
pH	6.43 ± 0.02
Índice de Absorción de Agua (g de gel/g de muestra seca)	2.79 ± 0.05
Índice de Solubilidad en Agua (g sólidos/100g de muestra seca)	1.66 ± 0.08
Dispersabilidad (%)	40 ± 0.02

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

aplicada a la biomasa microalgal. Los resultados son comparables con el trabajo realizado por Kim y col (2015) quienes evaluarón la composición química de *Dunaliella tertiolecta* encontrando un contenido de proteínas de alrededor de 35%, carbohidratos 51%, cenizas 13% y lípidos no fueron detectados. Además concuerdan las investigaciones de Lee y col (2013b) quienes evaluaron este tipo de biomasa para la producción de bioetanol encontrando un contenido de carbohidratos de alrededor del 52%. Del mismo modo resultados obtenidos por Francavilla y col (2015) son similares a los encontrados en la presente investigación, quienes analizaron la BR de *D. tertiolecta* encontrando un contenido de carbohidratos 60.1%, proteínas 31.4%, y no se detecto presencia de lípidos; esto podría ser atribuido a que se utilizó el mismo tipo de solvente en la extracción de lípidos.

En necesario resaltar que los macronutrientes presentes en las células de microalgas son altamente dependientes de las condiciones de cultivo y cosecha, al tipo de especie, así como también al método de extracción de aceite utilizado (Becker, 2013; Tibbetts y col, 2015b). Por otra parte, el contenido de proteína y carbohidratos de la BR de *Dunaliella tertiolecta* es comparable con fuentes tradicionalmente utilizadas en la elaboración de alimentos como son la leche, carne y huevo, los cuales presentan un contenido de proteínas y carbohidratos alrededor de 35 y 30%, respectivamente (FAO, 2014). Con base a esto se puede sugerir a la BR de *Dunaliella tertiolecta* como una buena fuente de proteínas y carbohidratos.

2 Propiedades fisicoquímicas

En el **Cuadro 14** se muestran las propiedades fisicoquímicas de la

biomasa residual de la microalga *Dunaliella tertiolecta*. La biomasa residual tuvo un valor Hunter “L” de 24.63, un valor “a” de -0.29 y un valor “b” de 6.93. Además, la biomasa residual presentó valores de actividad acuosa de 0.31, correspondiente a valores donde el desarrollo de actividad enzimática, crecimiento de microorganismos y reacciones químicas se llevan a cabo muy lentamente, lo cual significa una larga vida de anaquel (Fennema, 2001). La biomasa residual presentó un pH de 6.43. El pH de la BR de la microalga *D. tertiolecta* se encuentra dentro de lo reportado por Ramos-Suárez y Carreras (2014) quienes obtuvieron un valor de pH de 6.76 para la microalga verde *Scenedesmus*. Así como también con el trabajo de Park y Li (2012) reportaron un pH de 5.9 para la microalga verde *Nannochloropsis salina*.

El índice de absorción de agua (IAA) de la BR fue de 2.79 g de gel/g muestra seca y el índice de solubilidad en agua (ISA) de 1.66 g sólidos/100 g muestra seca. Dichos resultados concuerdan con Guil-Guerrero y col (2004) quienes evaluaron la biomasa de tres especies de microalgas encontrando un IAA de 3.1 g gel/g muestra. Los valores obtenidos en la presente investigación se encuentran dentro de lo reportado por Ramírez y Pacheco (2009) quienes encontraron en la harina de piña un IAA de 4.58 g gel/g muestra. El ISA se encuentra dentro de lo reportado por Rodríguez y col (2014) quienes evaluaron la adición de Spirulina a la formulación de una pasta encontrando un ISA de 1.42-1.58 g gel/g muestra. Para desarrollar cualquier sistema alimentario son de gran importancia el IAA y el ISA porque de ellos dependerán las propiedades funcionales del producto. Una buena absorción de agua en la biomasa residual puede sugerir la utilización de esta harina para la elaboración de productos de

panadería, bebidas, salsas, entre otros (Guil-Guerrero y col, 2004). La BR presentó una dispersabilidad de 40%; este es un parámetro de importancia en la elaboración de bebidas. Rochín-Medina (2011) evaluó la dispersabilidad de harina de garbanzo como ingrediente en la elaboración de una bebida la cual fue de 26.67%. También Montoya-Rodríguez (2011) evaluó la dispersabilidad de harina amaranto para elaborar una bebida la cual presentó un valor de alrededor de 30%. Los estudios realizados por Guil-Guerrero y col (2004), Rochín-Medina (2011) y Montoya-Rodríguez (2011) demuestran que la BR de la microalga en estudio presenta un porcentaje de dispersabilidad similar a otras materias primas utilizadas en la elaboración de bebidas.

D CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA BIOMASA RESIDUAL

Se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante (ORAC, ABTS y DPPH) de la BR de *D. tertiolecta*. Se obtuvieron extractos hidrofílicos etanólicos y metanólicos, de los cuales se obtuvieron los fitoquímicos libres y ligados (Suma de fitoquímico libre + ligado). Los resultados para el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante se muestran en el **Cuadro 15**.

Los compuestos fenólicos libres de los extractos hidrofílicos etanólicos, fueron de 0.61 mg equivalentes de ácido gálico/g muestra en base seca (mg EAG g⁻¹ bs), los ligados 1.60 mg EAG g⁻¹ (bs) y el contenido total de 2.21 mg EAG g⁻¹ (bs). Los extractos hidrofílicos metanólicos el contenido de compuestos fenólicos libres, ligados y total es de 0.53, 1.51 y 2.05 mg EAG g⁻¹ (bs), respectivamente. Al realizar la comparación de medias a los extractos

Cuadro 15. Capacidad antioxidante hidrofílica y contenido de compuestos fenólicos de la biomasa residual de la microalga *Dunaliella tertiolecta*

Propiedad nutracéutica	Extracto	
	Etanólico	Metanólico
Contenido de Fenólicos²		
Fenólicos libres	0.61 ± 0.02 ^a	0.53 ± 0.02 ^b
Fenólicos ligados	1.60 ± 0.09 ^a	1.51 ± 0.09 ^a
Total	2.21 ± 0.07 ^a	2.05 ± 0.07 ^b
Capacidad Antioxidante		
ORAC¹		
Fitoquímicos libres	21.37 ± 0.40 ^a	19.43 ± 0.44 ^b
Fitoquímicos ligados	95.11 ± 0.81 ^a	94.40 ± 0.74 ^a
Total	116.48 ± 0.58 ^a	113.83 ± 0.43 ^b
ABTS¹		
Fitoquímicos libres	25.90 ± 0.63 ^a	24.63 ± 0.32 ^b
Fitoquímicos ligados	47.58 ± 0.48 ^a	47.15 ± 0.32 ^a
Total	73.47 ± 0.66 ^a	71.78 ± 0.32 ^b
DPPH¹		
Fitoquímicos libres	1.17 ± 0.04 ^a	0.99 ± 0.03 ^b
Fitoquímicos ligados	3.44 ± 0.10 ^a	3.36 ± 0.10 ^a
Total	4.61 ± 0.10 ^a	4.35 ± 0.12 ^b

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

etanólicos y metanólicos por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) no se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos en los fenólicos ligados, mientras que para los fenólicos libres y el contenido total si se encontraron diferencias significativas. De los dos tipos de extractos, el extracto etanólico presentó el mayor ($p \leq 0.05$) contenido de compuestos fenólicos totales (2.21 vs 2.05 mg EAG g^{-1} bs) (**Cuadro 15**). Los resultados obtenidos fueron similares a los encontrados por Ahmed y col (2014), quienes utilizaron un extracto acuoso en *D. tertiolecta*, obteniendo 0.175 mg EAG g^{-1} (bs). Hemalatha y col (2013) quienes evaluaron extractos metanólicos de dos especies de microalgas verdes *Chlorella marina* y *Dunaliella salina*, encontrando valores de 0.4-0.78 mg EAG g^{-1} (bs). Ismaiel y col (2014), evaluaron extractos acuosos de 11 especies de microalgas encontrando valores de 0.5-9.69 mg EAG g^{-1} (bs). Esta discrepancia en los resultados puede explicarse debido a que a la naturaleza química de los compuestos que contribuyen a la respuesta antioxidante, a la estructura celular de estas especies, a la polaridad de los solventes utilizados para la extracción de los compuestos, así como también al ensayo utilizado para medición del contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante (Goiris y col, 2012). Pumas y Pumas (2014) evaluaron una mezcla de BR de diferentes microalgas (*Golenkinia sp.*, *Scenedesmus dimorphus*, *Chlorella sp.*, *Micractinium sp.*, y *Scenedesmus acutus*), en extractos etanólicos y acuosos reportando un contenido de compuestos fenólicos totales de 0.024 y 0.945 mg EAG g^{-1} (bs), respectivamente, dichos valores son menores a los reportados en la presente investigación (2.21 mg EAG g^{-1} (bs)), lo cuál podría deberse a que son microalgas de diferente especie, y dichas podrían presentar un perfil

diferente de compuestos fenólicos, los cuales le confieren la respuesta antioxidante. 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 fuentes de ciertos compuestos que pudieran solo encontrarse en este tipo de material (Ahmed y col 2014).

La capacidad antioxidante (Caox) hidrofílica total de la BR de *D. tertiolecta* evaluada por diferentes métodos, varió de 4.61 a 116.48 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs, para los extractos obtenidos con etanol, y de 4.35 a 113.83 ET g^{-1} , bs, para los extractos obtenidos con metanol (**Cuadro 15**). En el ensayo de ORAC la Caox que se encontro para los extractos hidrofílicos etanólicos fueron libres= 21.37 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs), ligados= 95.11 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs) y total= 116.48 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs). En cuanto a la Caox de los extractos hidrofílicos metanólicos libres, ligados y total (Suma de fitoquímico libre + ligado) los resultados fueron de 19.43, 94.40 y 113.83 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs), respectivamente. Al realizar la comparación de medias (Tukey; $p \leq 0.05$) para capacidad antioxidante, evaluada por el ensayo ORAC, los extractos etanólicos y metanólicos presentaron diferencias significativas en los fitoquímicos libres y los fitoquímicos totales, presentando la mayor capacidad antioxidante total el extracto etanólico (116.48 vs 113.83 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs). En el ensayo de ORAC la Caox se encontró dentro del rango reportado por Goiris y col (2012) evaluaron 32 especies de microalgas, encontrando valores que oscilaron entre 3.30-89.70 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs). Ahmed y col (2014) reportaron una Caox de 62.5 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs) en extractos acuosos de *D. tertiolecta*, dichos valores son menores a los encontrados en el presente trabajo (113.83 - 116.48 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs). Esta diferencia podría deberse a los

distintos métodos de extracción utilizados. Los resultados de Caox hidrofílica total obtenidos por el método de ORAC pueden compararse con los reportados para diversas frutas, verduras y leguminosas como: arándano (46 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs) (Prior y col 1998), fresa (35.77 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs), espinaca (15.15 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs), frijol pinto (77.79 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs) (Floegel y col 2011).

Por otra parte, los resultados de Caox obtenidos por el método de ABTS para los extractos hidrofílicos etanólicos fueron libres= 25.90 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs), ligados= 47.58 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs) y total= 73.47 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs). Para los extractos hidrofílicos metanólicos de fitoquímicos libres, ligados y totales, los resultados fueron de 24.63, 47.15, 71.78 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs), respectivamente. Al realizar la comparación de medias (Tukey; $p \leq 0.05$) para capacidad antioxidante, evaluada por el ensayo ABTS, los extractos etanólicos y metanólicos mostraron diferencias significativas en fitoquímicos libres y fitoquímicos totales, presentando la mayor capacidad antioxidante total el extracto etanólico (73.47 vs 71.78 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs) (**Cuadro 15**). Los resultados de Caox obtenidos por el método de ABTS son comparables al trabajo reportado por Goiris y col (2012) evaluaron la Caox tot *T. suecica* en extractos etanólicos encontrado valores de 56.46 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs), analizando 23 especies de microalgas. Goiris y col (2015), quienes evaluaron tres especies de microalgas reportando valores de 15 a 25 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs). Ryckebosch y col (2014) encontraron valores superiores de capacidad antioxidante al evaluar un extracto lipofílico de la microalga *T. suecica* encontrando una Caox= 105 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs), las diferencias encontradas podrían deberse al tipo de extracto utilizado ya que se ha reportado que las microalgas presentan un alto contenido de carotenoides, los cuáles son

compuestos de carácter lipofílico y a esto podría atribuirse su elevado valor en la capacidad antioxidante (Ahmed y col 2014).

La Caox, evaluada por el método de DPPH para los extractos hidrofílicos etanólicos fueron para los fitoquímicos libres $1.17 \mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs), ligados $3.44 \mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs) y totales $4.61 \mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs). Para los extractos hidrofílicos metanólicos de fitoquímicos libres, ligados y totales, los resultados fueron 0.99 , 3.36 y $4.35 \mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs). Al realizar la comparación de medias (Tukey; $p \leq 0.05$) para capacidad antioxidante, evaluada por el ensayo DPPH, los extractos etanólicos y metanólicos mostraron diferencias significativas en fitoquímicos libres y fitoquímicos totales, presentando la mayor capacidad antioxidante total el extracto etanólico ($4.61 \mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs). Los resultados de Caox evaluada por el método DPPH se encuentran dentro de lo reportado por Balboa y col (2013) quienes evaluaron extractos metanólicos de *Chlorella* y Cianobacterias reportando valores Caox total de $3-10.5 \mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs). Marxen y col (2007) evaluaron extractos metanólicos de cinco especies de microalgas, obteniendo valores de Caox total de $7.26-34.45 \mu\text{moles ET g}^{-1}$ (bs). Las diferencias entre los valores reportados por otros investigadores y de la presente investigación (4.35 y $4.61 \mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs), podrían deberse a que son otras especies de microalgas las evaluadas, además de que la biomasa de las microalgas evaluadas por otros investigadores es biomasa microalgal, mientras que en esta investigación las muestras analizadas fueron de BR, pudiendo en el proceso de extracción de aceite haberse eliminado compuestos que le proporcionen capacidad antioxidante a la biomasa, así como también, podría deberse a las condiciones utilizadas en el método de evaluación de Caox.

Los resultados obtenidos para Caox de la BR evaluada por el método DPPH (0.99-4.61 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs) pueden ser comparados con otros frutos y cereales como: ciruela (1.5 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs), tamarindo (2.04 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs), guanábana (1.36 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs) (Almeida y col 2011), quinoa (0.55-9.59 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs), amaranto (2.22-2.63 $\mu\text{moles ET g}^{-1}$, bs) (Repo de Carrasco y Encima, 2008).

Se observó en este trabajo que con el ensayo de ORAC se obtuvieron valores mayores para capacidad antioxidante, lo cual puede deberse a que el ensayo de ORAC es considerado biológicamente más relevante que ABTS, DPPH y otros protocolos similares ya que es más útil para extractos con múltiples constituyentes y mecanismos de reacción compleja involucrados (Ahmed y col 2014).

En general, los resultados muestran que la fracción de fitoquímicos ligados en el extracto etanólico presentaron la mayor Caox con los diferentes métodos empleados (ORAC, ABTS y DPPH); una tendencia similar mostraron los compuestos fenólicos. Esto podría deberse al método de extracción y tipo de solvente utilizado, el cual pudiera haber liberado y dejado expuestos un mayor número de compuestos, siendo estos los responsables del aumento en la Caox (Floegel y col 2011).

Diversos Investigadores han reportado que la polaridad del solvente utilizado para la extracción de compuestos con capacidad antioxidante es de gran importancia, ya que de este dependerá la cantidad y el tipo de compuestos que se liberen (Rodríguez-García y Guil-Guerreo 2008; López y col 2011; Hemalatha y col 2013). Este resultado concuerda con Guedes y col (2013)

quienes evaluaron tres especies de microalgas encontrando que el etanol mostró mejores resultados en la extracción de compuestos antioxidantes.

E FORMULACION ÓPTIMA (FO) A BASE DE BR Y SABORIZANTE PARA LA PREPARACIÓN DE UNA BEBIDA FUNCIONAL CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ALTA

En el **Cuadro 16** se muestran las diferentes combinaciones de variables independientes [concentración de biomasa residual (CBR) y concentración de saborizante (CS)] utilizadas para la producción de las formulaciones [(0-9 g CBR + 0-3 g CS) /300 mL de bebida] empleadas en la elaboración de bebidas de valor nutricional/nutracéutico alto y los valores experimentales de la variable de respuesta [capacidad antioxidante (Caox) de las bebidas].

1 Modelos experimentales de predicción

A partir de los datos experimentales de Caox de las formulaciones mostradas en el **Cuadro 16** se obtuvieron modelos de predicción, como resultado de ajustar el polinomio de la **Fig 13**, el cual relaciona la variable de respuesta (Caox) evaluadas a las formulaciones con las variables independiente (CBR y CS). A estos modelos de predicción se les probó su idoneidad y ajuste por análisis de varianza (Anova, **Cuadro 17**). Montgomery (1999) reportó que un 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 92.97 y 515.92

Cuadro 16. Diseño experimental¹ empleado para obtener diferentes combinaciones (formulaciones) de concentración de biomasa residual y saborizante (CBR y CS), para la preparación de bebidas funcionales a base de biomasa residual de la microalga *D. tertiolecta*, y resultados experimentales de la variable de respuesta (Caox)

Tratamiento ²	Variables de proceso ³		Variable de respuesta ⁴
	CBR	CS	Caox (ABTS) ⁵
1	1.32	0.44	92.97
2	7.68	0.44	429.81
3	1.32	2.56	212.57
4	7.68	2.56	515.92
5	0.00	1.50	111.74
6	9.00	1.50	466.15
7	4.50	0.00	346.32
8	4.50	3.00	510.21
9	4.50	1.50	284.21
10	4.50	1.50	306.65
11	4.50	1.50	289.90

¹Diseño de central compuesto rotatable.

²No corresponden al orden del proceso.

³**CBR**= Concentración de biomasa residual (g/300 mL de bebida), **CS**= Concentración de saborizante (g/300 mL de bebida).

⁴**Caox**= Capacidad Antioxidante

⁵µmoles equivalentes de Trolox (ET)/300 mL de bebida.

Cuadro 17. Coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos experimentales de predicción mostrando la relación entre la variable de respuesta (Caox) y variables del proceso (CBR, CS) para la elaboración de una bebida funcional a partir de biomasa residual de *D. tertiolecta*

Coeficientes	Capacidad antioxidante	
	Caox	
Intercepto	Codificado	Sin codificar
β_0	+284.66	+135.76
Lineal		
β_1	+145.18 ^{***}	+45.62 ^{***}
β_2	+47.68 ^{***}	-120.16 ^{***}
Cuadrático		
β_{11}	NS	NS
β_{22}	+61.92 ^{***}	+55.04 ^{***}
Interacciones		
β_{12}	NS	NS
P_{modelo}	0.0001	
$P_{\text{falta de ajuste}}$	0.1292	
CV	9.80	
R²	0.9596	
R²_{ajustada}	0.9462	
R²_{predicha}	0.8914	

*Nivel de significancia a $p \leq 0.10$

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

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

NS, no significativo

µmoles equivalentes de Trólox (ET)/ 300 mL de bebida (**Cuadro 16**) correspondientes a los tratamientos 1 y 4 respectivamente. En el **Cuadro 17** se muestran la estimación de los coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos de predicción, mostrando las relaciones entre la capacidad antioxidante y las variables independientes CBR y CS.

El análisis de varianza mostró un modelo cuadrático significativo ($p=0.0001$) para Caox. Este análisis también mostró que la Caox de las bebidas fue significativamente dependiente de los términos lineales de concentración de biomasa residual (CBR) y concentración de saborizante (CS), así como del término cuadrático (CS^2).

El modelo de predicción para la Caox de las formulaciones usando variables codificadas fue:

$$\text{Caox} = 284.66 + 145.18X_1 + 47.68 X_2 + 61.92 X_2^2$$

El modelo de predicción para la Caox de las bebidas usando variables no codificadas fue:

$$\text{Caox} = 135.76 + 45.62\text{CBR} - 120.16\text{CS} + 55.04\text{CS}^2$$

Este modelo de predicción explicó el 95.96% de la variabilidad total ($p=0.0001$) de los valores de Caox de las bebidas. El coeficiente de determinación R^2 ajustada del modelo fue 0.9462 y la falta de ajuste fue no significativa (0.1292). Además, la dispersión relativa de los puntos con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue de 9.80%. Estos valores indican que el modelo experimental para la Caox de las bebidas fue adecuado y reproducible. A partir de los modelos matemáticos de predicción se construyeron gráficos de superficie de respuesta y de contornos (**Fig 15**) en las cuales se observa el

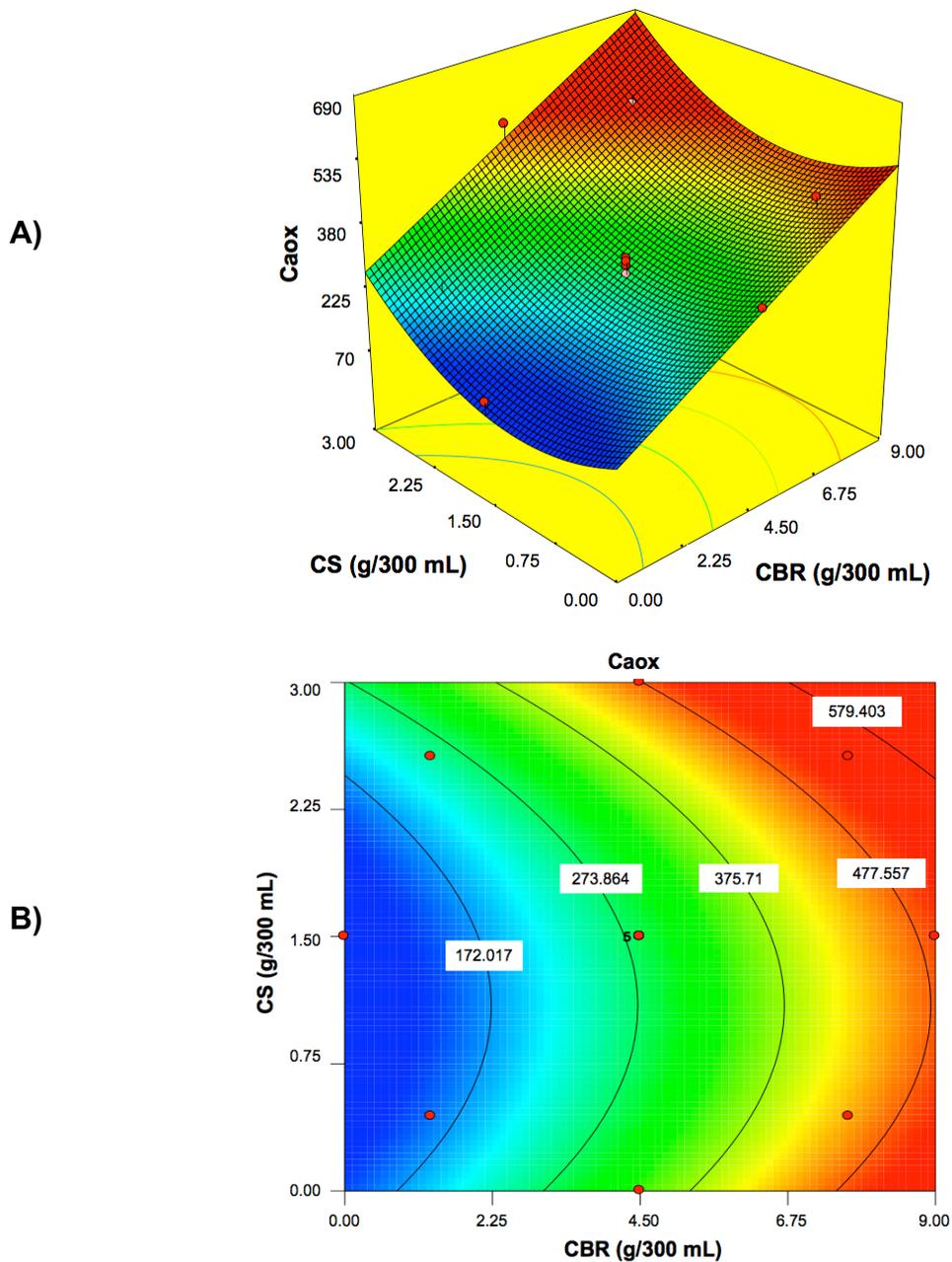


Fig 15. Gráficas de superficie de respuesta (A) y contornos (B) mostrando el efecto de las variables independientes [CBR: concentración de biomasa residual (g/300 mL de bebida), CS: concentración de saborizante (g/300 mL de bebida)] sobre la capacidad antioxidante [Caox (μ moles ET/300 mL de bebida)] de bebidas nutraceuticas elaboradas con formulaciones a base de biomasa residual y saborizante.

efecto de las variables independientes CBR y CS sobre la capacidad antioxidante de las bebidas. En los gráficos se observa que ambas variables del proceso (CBR y CS) tuvieron un efecto significativo en el comportamiento de la capacidad antioxidante de las bebidas. El valor de Caux más bajo ($92.97 \mu\text{moles ET}/300 \text{ mL}$ de bebida) se localizó a una CBR de 1.32 g por 300 mL de bebida y una CS de 0.44 g por 300 mL de bebida. A medida que aumentaba tanto el contenido de biomasa residual como de saborizante en la formulación, la Caux aumentaba, esto podría ser debido a que la biomasa residual aporta la mayor proporción de Caux. Es por ello que, los valores más altos de Caux ($478\text{-}579 \mu\text{moles ET}/300 \text{ mL}$ de bebida) se alcanzaron al tener el mayor porcentaje de biomasa residual en la formulación.

2 Optimización

Se aplicó el método gráfico para obtener una formulación optimizada (FO), a base de biomasa residual y saborizante (CBR y CS óptimas), adecuada para elaborar bebidas funcionales con valores de capacidad antioxidante altos. El modelo de predicción obtenido para la variable de respuesta Caux se utilizó para obtener gráficos de contornos y superficie, en los cuales se seleccionó el punto dentro de la región experimental donde el valor de Caux fuera lo más alto posible. El valor de Caux más alto fue observado a una $\text{CBR}=9.0 \text{ g}/300 \text{ mL}$ de bebida y $\text{CS}=3.0 \text{ g}/300 \text{ mL}$ de bebida, con una $\text{Caux}= 579.403 \mu\text{moles ET}/300 \text{ mL}$ de bebida, siendo estas las condición óptimas del proceso.

F CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL Y NUTRACÉUTICA (CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES) DE LA FORMULACIÓN OPTIMIZADA

En el **Cuadro 18** se muestra la composición nutrimental, Caox y contenido de compuestos fenólicos totales de la formulación optimizada a base de la biomasa residual de *D. tertiolecta* y saborizante (CBR=9.0 g/300 mL de bebida y CS=3.0 g/300 mL de bebida), empleada para la elaboración de una formulación optimizada (**FO**) presentó un contenido en base seca de proteína 25.50%, lípidos 0.30%, cenizas 10.34%, carbohidratos 63.85%, fibra dietaria total 27.20%, de la cuál fibra soluble fue 2.3% y fibra insoluble fue 24.90%.

El contenido de compuestos fenólicos de la **FO** de los extractos hidrófilos libres fue de 68.14 mg equivalentes de ácido gálico/100 g muestra en base seca (mg EAG/100 g muestra, bs), para los extractos hidrófilos ligados el contenido fue 66.21 mg EAG/100 g muestra (bs) y el contenido de compuestos fenólicos totales fue de 127.14 mg EAG/100 g muestra (bs).

En cuanto a la Caox total de la **FO**, evaluada por el método ORAC los resultados fueron para extractos hidrofílicos de compuestos libres, ligados y totales de 3138.73, 9728.62 y 12550.37 μ moles ET/100 g muestra (bs), respectivamente. Los resultados de capacidad antioxidante evaluada por el método ABTS los resultados fueron 1469.57, 4627.50 y 5946.87 μ moles ET/100g de muestra (bs), para extractos hidrofílicos de compuestos libres, ligados y totales, respectivamente. Por el método de DPPH los resultados de capacidad antioxidante fueron 117.65, 443.17 y 547.01 μ moles ET/100 g de muestra (bs), para extractos hidrofílicos de compuestos libres, ligados y totales, respectivamente.

Actualmente existe una gran demanda por parte de los consumidores de sustitutos de leche (no lácteos) con un alto grado de aceptación y funcionalidad.

Cuadro 18. Contenido nutrimental, capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos de la formulación optimizada (FO) preparada a base de BR de microalga *D. tertiolecta* y saborizante, adecuada para elaborar una bebida funcional con capacidad antioxidante alta.

Propiedades	FO
Composición química (% , bs)	
Proteínas	25.50 ± 0.59
Lípidos	0.30 ± 0.03
Cenizas	10.34 ± 0.01
Carbohidratos	63.85 ± 0.57
Fibra Dietaría Total	27.20 ± 0.31
Soluble	2.3 ± 0.01
Insoluble	24.90 ± 0.32
Contenido de Fenólicos²	
Fenólicos libres	68.14 ± 4.36
Fenólicos ligados	66.21 ± 3.03
Total	127.14 ± 7.07
Capacidad antioxidante	
ORAC¹	
Fitoquímicos libres	3138.73 ± 89.33
Fitoquímicos ligados	9728.62 ± 196.78
Total	12550.37 ± 105.57
ABTS¹	
Fitoquímicos libres	1469.57 ± 75.85
Fitoquímicos ligados	4627.50 ± 96.40
Total	5946.87 ± 54.28
DPPH¹	
Fitoquímicos libres	117.65 ± 2.41
Fitoquímicos ligados	443.17 ± 10.39
Total	547.01 ± 12.49

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

Es en este sentido que bebidas a base de granos como cereales y leguminosas han sido estudiadas, debido a que tienen un enorme potencial para cumplir con esta expectativa y actuar como vehículos potenciales de compuestos funcionales tales como antioxidantes, fibra dietética, minerales y vitaminas. Sin embargo, para la utilización de cereales y leguminosas para la preparación de bebidas es necesario procesarlas. Una variedad de tecnologías (por ejemplo: cocción, germinación y molienda) se utilizan habitualmente para procesar granos, pero la extrusión, la fermentación y la germinación son de las mejores opciones para potenciar las propiedades nutricionales, nutracéuticas y sensoriales, así como alargar la vida de anaquel, de los alimentos procesados con esta tecnología. Es por ello que a continuación se presentan algunos ejemplos de formulaciones, a base de cereales y leguminosas procesados por estas tecnologías, empleadas para elaborar diferentes bebidas funcionales, con la finalidad de contrastarlas con la **FO** obtenida en el presente trabajo. Uno de estos trabajos fue el realizado por Rochín-Medina y col (2015) quienes evaluaron una mezcla de harinas de maíz y garbanzo extrudidos (MHMGE), la cual se empleó como base para elaborar una bebida funcional con capacidad antioxidante y aceptabilidad sensorial altas. Estos autores elaboraron una formulación a partir de la MHMGE (22g de mezcla=13.2g de harina de maíz extrudido + 8.8g de harina de garbanzo extrudido) + sacarosa (3.2 g) + edulcorante bajo en calorías (Azúcar BC Metco ®, que contiene una mezcla de sacarosa, edulcorantes de intensidad alta, inulina, fructo-oligosacáridos con dos veces más poder edulcorante que la sacarosa) (4.8 g) + vainilla en polvo (1 g) para la preparación de las bebidas funcionales [a la formulación se le adicionó

agua purificada (168 mL) para la preparación de 200 mL de bebida]. La formulación obtenida por estos autores a base de MHMGE presentó un contenido de proteína de 10.34%, lípidos 2.41%, carbohidratos 60.94% y capacidad antioxidante 6231 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ de muestra (bs) (método ORAC). Asimismo, Reyes-Moreno y col (2012) elaboraron una formulación a base de una mezcla de harinas de maíz y frijol extrudidos (MHMFE) (25g de mezcla=15g de harina de maíz extrudido + 10g de harina de garbanzo extrudido) + edulcorante bajo en calorías (Azúcar BC Metco ®) (6.4 g) + vainilla en polvo (1 g) para la preparación de una bebida funcional [a la formulación se le adicionó agua purificada (168 mL) para la preparación de 200 mL de bebida] con actividad antioxidante y aceptabilidad sensorial altas; la formulación tuvo 11.00% proteína, 3.03% lípidos, 58.75% carbohidratos y 10,069 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ de muestra (bs) (método ORAC). También, Reyes-Moreno y col (2014) desarrollaron una bebida nutracéutica con potencial antioxidante, antihipertensivo y antimutagénico utilizando una formulación obtenida a partir de una mezcla de harinas de maíz de calidad proteínica extrudido y de frijol común fermentado con *Rhizopus oligosporus* (fermentación en estado sólido) (MHMEFF) (25g de mezcla=15g de harina de maíz extrudido + 10g de harina de frijol fermentado) + edulcorante bajo en calorías (Azúcar BC Metco ®) (6.4 g) + vainilla en polvo (1 g); la formulación presentó un contenido de proteína, lípidos, minerales, carbohidratos y capacidad antioxidante de 12.41%, 2.69%, 0.81%, 74.41% y 10,781 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ de muestra (bs) (método ORAC), respectivamente. De manera similar, Luana y col (2014) evaluaron harina de hojuelas de avena para elaborar una bebida fermentada funcional. Ellos probaron diferentes opciones tecnológicas,

incluyendo la cantidad de avena, el tipo de inóculo y la adición de diferentes preparados enzimáticos (preparados con actividad xylanasa, endoglucanasa, ácido ferúlico esterasa, β -glucanasa y amilasa). La bebida que contenía 25% (peso / peso) de avena (la composición restante de la bebida fue agua, 75%) y fermentada con la cepa LP09 de *Lactobacillus plantarum* (bacterias acidolácticas) se consideró óptima con base en propiedades sensoriales y tecnológicas. La adición de enzimas previo a la fermentación favoreció el crecimiento del cultivo bacteriano, acortado el tiempo necesario para alcanzar un pH de 4.2 en aproximadamente 8 h, favoreciendo el proceso de fermentación. El análisis sensorial mostró que la bebida a base de avena fermentada tenía características típicas de una bebida tipo yogur. Ellos reportaron un contenido de proteína de 9.8%, lípidos de 5.5%, cenizas de 2.9%, carbohidratos de 70.4% y fibra dietaria total de 13.95% (3.03% de fibra dietaria soluble + 10.92 de fibra dietaria insoluble) en la harina de avena empleada para elaborar la bebida fermentada funcional tipo yogur. En este trabajo la actividad antioxidante fue evaluada con el método DPPH en extractos metanólicos al 80% de esta harina de avena, la cual presentó un 73.3% de capacidad atrapadora del radical DPPH. Perales-Sánchez y col (2014) optimizaron el bioproceso de germinación para obtener harina de amaranto germinado optimizada (HAG) con actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos altos. Ellos analizaron la HAGO encontrando proteínas en un 18.21%, lípidos en un 5.36%, fibra dietaria total en 23.86% de la cuál fibra soluble fue 3.55% e insoluble 20.31%, contenido de compuestos fenólicos totales en 248 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de muestra (bs) y actividad antioxidante en 21,560 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$

de muestra (bs) por el método ORAC y 12,160 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ de muestra (bs) por el método ABTS. En este trabajo de investigación se concluyó que la HAGO podría ser utilizada como fuente de antioxidantes naturales, proteínas y fibra dietética en la formulación de alimentos funcionales como bebidas.

Así como existen bebidas funcionales elaboradas a partir de harinas de granos procesados, también existe una gran variedad de bebidas funcionales elaboradas a partir de frutas y vegetales, las cuales también tienen buenos niveles de antioxidantes y potenciales propiedades benéficas a la salud para la prevención y/o cura de enfermedades, principalmente las crónico-degenerativas. Sin embargo, la mayoría de las bebidas son evaluadas como tal, y no se encontraron reportes donde se haya evaluado la formulación o ingredientes con los que se elaboraron dichas bebidas.

Al comparar la **FO** con las formulaciones elaboradas a base de harinas de cereales y leguminosas procesadas, y sus mezclas, edulcorantes y otros ingredientes mencionadas anteriormente, se puede observar que **FO** presentó un mayor contenido de proteína, minerales, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, y menor contenido de lípidos y carbohidratos, excepto que la harina de amaranto germinada optimizada, por lo que se puede decir que **FO** tiene un potencial nutricional y nutracéutico similar que dichas harinas de granos procesados, por lo que **FO** podría ser utilizada como fuente de antioxidantes naturales, proteínas, minerales y fibra dietética en la formulación de alimentos funcionales como bebidas, al igual que las formulaciones mencionadas, y que fueron empleadas con este propósito.

G CONTENIDO NUTRIMENTAL Y ENERGÉTICO, CAPACIDAD

ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA BEBIDA FUNCIONAL PREPARADA A PARTIR DE LA FORMULACIÓN OPTIMIZADA A BASE DE BIOMASA RESIDUAL Y SABORIZANTE

La bebida funcional elaborada a partir de la **FO** se basó en pruebas preliminares para definir las cantidades de los ingredientes utilizados (datos no mostrados). La norma mexicana NMX-F-439-1983 para alimentos y bebidas no alcohólicas define una bebida nutritiva cuando contiene al menos 1.5% de proteína o hidrolizados de proteínas con una calidad equivalente a la de la caseína; también establece que la bebida debe contener 10 a 25% del ingrediente principal usado para prepararla. Estas bebidas también pueden contener etanol hasta un 2%, edulcorantes, aromatizantes, dióxido de carbono, jugos, pulpa de frutas, verduras o leguminosas y otros aditivos autorizados por la Secretaría de Salud y Asistencia de México. Además, la Secretaría de Salud y Asistencia de México, recomienda que una porción de 200 mL de bebida debe contener no más de 140 kcal. La bebida funcional preparada en presente estudio contenía 3% de **FO**, ingrediente principal usado para prepararla, y 1% de proteína, por lo que no cumplió con la norma NMX-F-439-1983 en este aspecto.

En la presente investigación no se emplearon mayores cantidades de biomasa residual para preparar las bebidas funcionales debido a que la cantidad de muestra obtenida de este material durante las primeras etapas del trabajo experimental de esta investigación fue reducida, básicamente por problemas con el cultivo de la microalga, por lo tanto, para seguir con las etapas posteriores a la producción de la microalga, se realizaron evaluaciones a nivel de miligramos y microgramos de la mayoría de las propiedades estudiadas (composición química,

propiedades funcionales, capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos) a la biomasa residual en la presente tesis. A partir de los valores obtenidos de las propiedades de **FO** se realizaron cálculos para estimar la composición química, capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos de la bebida funcional elaborada con **FO**. Debido a lo anteriormente mencionado, es necesario en un futuro utilizar mayores cantidades de biomasa residual, para que las bebidas funcionales elaboradas cumplan a calidad con la norma mexicana NMX-F-439-1983 para alimentos y bebidas no alcohólicas

El **Cuadro 19** muestra la composición nutrimental de la bebida elaborada a partir de la formulación optimizada a base de la BR de *D. tertiolecta* y saborizante (CBR=9.0 g/300 mL de bebida y CS=3.0 g/300 mL de bebida), así como su aporte calórico, Caox y contenido de compuestos fenólicos. Una porción de 300 mL de la bebida de valor nutricional /nutracéutico alto elaborada a partir de la **FO** presentó un contenido de proteínas 2.98%, lípidos 0.03%, minerales 1.21%, carbohidratos 7.47%, fibra dietaría total 3.18%, de la cuál fibra soluble fue 0.26% y fibra insoluble 2.91%, así como un aporte calórico de 42.07 kcal. Estos resultados fueron obtenidos mediante el recalcu de los datos obtenidos en la formulación optimizada; a la cuál se le realizaron todas las pruebas antes descritas. Del contenido energético total de la bebida las proteínas representaron alrededor de 28.33%, los lípidos 0.64% y los carbohidratos 71.02%. 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 (Cereza-Mezquita y col 2007). Con base a lo anterior, la bebida presentó un porcentaje energético

Cuadro 19. Contenido nutrimental, capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos para una porción de 300 mL de una bebida nutracéutica preparada con la formulación optimizada a base de biomasa residual de la microalga *Dunaliella tertiolecta* y edulcorante

Propiedad	Bebida Funcional
Composición Nutrimental (g)	
Proteína	2.98 ± 0.06
Lípidos	0.03 ± 0.01
Minerales	1.21 ± 0.01
Carbohidratos	7.47 ± 0.06
Fibra Dietaria Total	3.18 ± 0.03
Soluble	0.26 ± 0.01
Insoluble	2.91 ± 0.03
Energía (kcal)	42.07
Capacidad Antioxidante (µmol ET)	
ORAC	1506.04
ABTS	713.62
DPPH	65.64
Contenido de Fenólicos Totales (mg EAG)	15.25

Los valores representan el promedio de tres réplicas ± desviación estándar. kcal: kilocalorías; µmol ET: micromoles equivalentes de trolox; mg EAG: miligramos equivalentes de ácido gálico.

proveniente de carbohidratos mayor (71.02%), 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 aumentó el contenido 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 22.92% y 15.68% del requerimiento diario de proteína para niños y niñas de 1-3 y 4-8 años, respectivamente.

Una porción de 300 mL de la bebida funcional preparada con **FO** aporta un contenido de compuestos fenólicos de 15.25 mg EAG. En cuanto a la capacidad antioxidante total por el método de ORAC, ABTS y DPPH de la bebida funcional fue de 1506.04, 713.62 y 65.64 μ moles ET/300 mL de muestra respectivamente.

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) recomienda una ingesta de 3,000-5,000 μ moles ET/día para mantener un nivel adecuado de antioxidantes en el organismo (USDA, 2010). Una porción de 300 mL de la bebida elaborada a partir de la **FO** aporta entre el 50.20-30.12% de la ingesta diaria de antioxidantes recomendada.

Al igual que se mencionó en la sección anterior, existen bebidas funcionales a base de granos como cereales y leguminosas procesados que han sido estudiadas, debido a que tienen un enorme potencial como sustitutos de

leche para actuar como vehículos potenciales de compuestos funcionales tales como antioxidantes, fibra dietética, minerales y vitaminas. Es por ello que a continuación se presentan resultados reportados en la literatura (Reyes-Moreno y col, 2012; 2014; Rochín-Medina y col, 2015) de composición nutrimental, contenido energético y capacidad antioxidante de bebidas funcionales elaboradas a partir de granos como maíz, garbanzo, frijol, amaranto y avena procesados por extrusión, fermentación y germinación, las cuales ya fueron descritas en la sección anterior, con la finalidad de contrastarlas con la bebida funcional preparada a partir de **FO** y saborizante en el presente trabajo. Los resultados de estas bebidas funcionales fueron calculados para porciones de 300 mL de bebida a partir de la información reportada en los diferentes trabajos de investigación, para efectos de comparación con la bebida funcional preparada con **FO** en el presente trabajo de investigación. Porciones de 300 mL de estas bebidas tuvieron 5-6 g de proteína, 1.2-1.5 g de lípidos, 0.39 g de minerales, 28.2-35.7 g de carbohidratos, 139-147 kcal de energía, 2,991-5,175 μ moles ET de capacidad antioxidante. La bebida funcional elaborada con **FO** presentó menor contenido de proteína, lípidos, carbohidratos, energía y capacidad antioxidante, y mayor contenido de minerales (**Cuadro 19**) que lo reportado para las bebidas elaboradas con harinas de granos procesados y otros ingredientes como edulcorantes y vainilla.

A continuación, también se presentan resultados de capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos de bebidas funcionales elaboradas a partir de frutas, vegetales e infusiones, las cuales también presentan niveles aceptables de antioxidantes, con la finalidad de contrastarlas

con la bebida funcional preparada a partir de **FO** y saborizante en el presente trabajo. Uno de estos trabajos fue el realizado por Floegel y col (2011) quienes evaluaron la capacidad antioxidante a un gran número de muestras de alimentos que contienen una gran variedad de frutas, verduras y bebidas que son los principales contribuyentes a la ingesta de antioxidantes en la dieta de los Estados Unidos de América. Ellos reportaron valores de actividad antioxidante de 1224 a 11,619 $\mu\text{mol ET}/300\text{ mL}$ de bebida por el método ORAC. Además, Ninfali y col (2014) analizaron jugos de fruta, néctares y bebidas de fruta encontrando valores de 458-13,395 $\mu\text{moles ET}/300\text{ mL}$ para Caox (método ORAC). Otro trabajo es reportado por Kim y col (2014) quienes evaluaron diferentes bebidas comerciales de fruta en Korea (uva, naranja, manzana, mandarina, mora azul, fresa, kiwi, mango) encontrando valores de 36.12-549.99 mg EAG/300 mL, para el contenido de compuestos fenólicos. Así como también, Moreno-Montorro y col (2015) analizaron jugos de frutas como uva, piña y naranja donde encontraron valores que van de 94.2-546 mg EAG/300 mL para capacidad antioxidante evaluada para el contenido de compuesto fenólicos. Diamantini y col (2015) evaluaron bebidas energéticas del mercado local en Italia, las cuales presentan valores de 63-17,160 $\mu\text{moles ET}/300\text{ mL}$ por el método de ORAC. Magalhães y col (2007) encontraron menores valores de Caox en jugos, infusiones de té, vinos de uva y cervezas del mercado local de Portugal encontrando una Caox de 54.3-462 $\mu\text{moles ET}/300\text{ mL}$, evaluada por el método ABTS. Pellegrini y col (2003) evaluaron diferentes bebidas no alcohólicas obteniendo valores que van desde 27-990 $\mu\text{moles ET}/300\text{ mL}$, dicha Caox fue evaluada por el método de ABTS.

Pisoschi y col (2009) evaluaron jugo de durazno, refresco de limón y jugo de frutas encontrando valores de 37.2, 46.2 y 120 μ moles ET/300 mL, respectivamente, para capacidad antioxidante evaluada por el método DPPH. Así como también Diamantini y col (2015) evaluaron bebidas energéticas quienes encontraron valores de 159-16,347 μ moles ET/300 mL para capacidad antioxidante evaluada por el método.

La bebida funcional elaborada a partir de **FO** y saborizante presentó valores de capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos dentro del rango reportado para las diferentes bebidas funcionales elaboradas a partir de frutas, vegetales e infusiones mencionadas en el párrafo anterior.

IX CONCLUSIONES

1. El cultivo de *D. tertioleca* presento un comportamiento sigmoïdal con valores máximos de crecimiento en el día 7, presentando valores de tasa de crecimiento específico (μ)= 0.27 d⁻¹ y un tiempo de duplicación (t_d) = 2.59 d.
2. El uso de quitosano como floculante orgánico presento una alta eficiencia en el proceso de floculación sin modificar el pH de la microalga *D. tertioleca*, donde se obtuvieron porcentajes de eficiencia de recuperación desde un 83.35 a 94.64%.
3. La biomasa residual de *D. tertioleca* presentó un contenido de proteína, lípidos, minerales y carbohidratos de 32.95, 0.36, 12.38 y 54.30% (bs), respectivamente, así como un contenido de fibra dietaría total de 33.85% (bs) de la cuál fibra soluble fue 1.07% e insoluble fue 32.77%.
4. La biomasa residual de *D. tertioleca* presentó una actividad acuosa de 0.31 y un pH de 6.43. El IAA fue de 2.79 g gel/g de muestra (bs), el ISA de 1.66 g sólidos/100g de muestra (bs) y el porcentaje de dispersabilidad fue de 40%.
5. La biomasa residual de *D. tertioleca* presentó un contenido de fenólicos totales (CFT) de 221 mg equivalentes de ácido Gálico (EAG)/ 100g de muestra (bs) y una capacidad antioxidante (Caox) de 11,648, 7,347 y 461 μ moles equivalente de Trolox (ET)/ 100g de muestra (bs) empleando los métodos ORAC, ABTS y DPPH, respectivamente.
6. Se obtuvo una formulación optimizada (**FO**) a partir de biomasa residual de *D. tertioleca* y saborizante: **FO** = 9.0 g/300 mL de bebida de contenido de biomasa residual (CBR) + 3.0 g/300 mL de bebida de contenido de saborizante (CS).
7. La **FO** presentó un contenido en base seca de proteínas de 25.50%, lípidos 0.30%, minerales 10.34%, carbohidratos 63.85%, fibra dietaría total 27.20%, de la

cuál un 2.3% fue fibra soluble y 24.90% fibra insoluble, CFT de 127.14 mg EAG/100g de muestra, Caox total de 12550.37, 5946.87 y 547.01 μ moles ET/100 g de muestra evaluada por los métodos ORAC, ABTS y DPPH, respectivamente.

8. Una porción de 300 mL de la bebida funcional preparada a partir de **FO** contiene 2.98 g de proteínas, 0.03 g de grasas, 1.21 g de minerales, 7.47 g de carbohidratos, un contenido energético de 42.07 kcal, un CFT de 15.25 mg EAG y una Caox total por el método ORAC, ABTS y DPPH de 1506.04, 713.62 y 65.64 μ moles ET, respectivamente.
9. Una porción de 300 mL de bebida nutracéutica preparada a partir **FO** aporta el 22.92% y 15.68% del requerimiento diario de proteína para niños y niñas de 1-3 y 4-8 años, respectivamente. Además, aporta el 50.20-30.12% de la ingesta diaria de antioxidantes recomendada.
10. La bebida funcional elaborada a partir de **FO** y saborizante puede ser usada como una alternativa a bebidas con valor nutricional/nutracéutico bajo tales como las preparadas con agua, azúcares simples, saborizantes y colorantes artificiales, las cuales son ofrecidas ampliamente en el mercado.

X BIBLIOGRAFÍA

- Abalde J, Fabregas J. 1991.** β -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* culture with different nitrogen sources. *Bioresource Technology* 38:121-125.
- Acacio-Chirino NJ, Zumalacárregui-Cárdenas LM, Almera-Medina JC, Barreno-Medina DM, Betancourt-Bentauncourt RA, Colina-Luchón RL. 2013.** Desarrollo de un procedimiento para la extracción de β -Caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella sp.* en la salina Las Cumaraguas. *Revista Cubana de Química* 30(2):214-228.
- ADA. 2008. American Diabetes Association.** Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 31(1):512-554.
- Adom KK, Liu RH. 2002.** Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(21):6182-6187.
- Ahmad AL, Mat Yasin NH, Drek CJC, Lim JK. 2011.** Optimization of microalgae coagulation process using chitosan. *Chemical Engineering Journal* 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.
- Almeida BM, Machado PH, Campos AM, Do Prado GM, Carbalho CE, Arraes G, Gomes TL. 2011.** Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International* 44:2155-2159.

- Anderson JW, Conway HR, Pfeifer VF, Griffin. 1969.** Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. *Journal of Cereal Science Today* 14:4-12.
- AOAC. 1999.** Official Methods of Analysis, 16^a ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Arias-Peñaranda MT, Martínez-Roldán AJ, Cañizares-Villanueva RO. 2013.** Producción de biodiesel a partir de microalgas parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana* 18(1):43-68.
- Atlic A, Koller M, Scherzer D, Kutschera C, Grillo FE, Horvat P, Chiellini E, Braunegg G. 2011.** Continuous production of poly ([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. *Applied Microbiology Biotechnology* 91:295-304.
- Avagyan AB. 2008.** Microalgae: Big Feed Potential in a Small Package. *Feed International* [Serie en línea]. 18 p. Disponible de: [www.feedindustry.network.com]. Publicado en marzo de 2008.
- Babadzhanov AS, Abdusamatova N, Yusupova FM, Faizullaeva N, Mezhlumyan LG, Malikova MK. 2004.** Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. *Chemical Nature Compound* 40(3):276-279.
- 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.
- Band-Schmidt CJ. 1999.** Efecto de la composición bioquímica de microalgas sobre el valor nutritivo de dos cepas de *Artemia*. [Tesis de Maestría]. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marianas (CICIMAR). p 63.

- Barba FJ, Grimi N, Vorobiez E. 2015.** New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. *Food Engineering Reviews* 7:45-62.
- Barros AI, Gonçalves AL, Simoes, Pires JCM. 2015.** Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41:1489-1500.
- Batista AP, Gouveia L, Bandarra NM, Franco JM, Raymundo A. 2013.** Comparison of Microalgal Biomass Profiles as Novel Functional Ingredient for Food Products. *Algal Research* 2:164-173.
- Becker EW. 2013.** Microalgae for human and animal nutrition. En: Richmond A, Hu Q (eds) *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. 2^a ed. Wiley-Blackwell: Oxford. p 461-503.
- Ben-Amotz A, Avron M. 1982.** The potential use of *Dunaliella* for the production of glycerol, β -carotene and high-protein feed. *Biosaline research: A look to the future*. New York: Plenum Publishing Corporation. p 214.
- Bigliardi B, Galati F. 2013.** Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science and Technology* 31:118-129.
- Biruete GA, Juárez HE, Sieiro OE, Romero VR, Silencio BJ. 2009.** Los nutraceuticos, lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de Pediatría* 76(3): 136-145.
- Bishop WM, Zubeck HM. 2012.** Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *Journal Nutrition Food Sciences* 2(5): 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, Borowitzka LJ. 1988. Microalgal Biotechnology. En: Borowitzka MA y Borowitzka LJ (Eds.). New York: Cambridge University Press. p 447.

Borowitzka MA, Siva CJ. 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (*Chlorophyta*, *Dunaliellales*) with emphasis on the marine and halophilic species. Journal of Applied phycology 19:567-590.

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

Bourned Partners. 2013. Sector Report: Nutraceuticals Industry. Disponible en: www.bourned-partners.com. Revisado el 13 de Marzo del 2016.

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

Cao G, Verdon CP, Wu AHB, Wang H, Prior RL. 1995. Automated oxygen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARA II. Clinical Chemistry 41:1738-44.

Carballo-Cárdenas EC, Tuan PM, Janssen M, Wijffels RH. 2003. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. Biomolecular Engineering 20:139-147.

Castillo-Reyna J. 2011. Effect of different agitation systems and protocols on the growth of *Nicotiana tabacum* cells: Comparison of growth kinetics in

Erlenmeyer flasks, conventional stirred tanks, and eccentrically agitated tank bioreactors. [Tesis doctoral]. Monterrey, México: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. p 85.

Cenci A, Walter C. 2010. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients* 2:611-625.

Cencic A, Chingwaru W. 2010. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients* 2:611-625.

Cerezal-Mezquita P, Carraco-Verdejo A, Pinto-Tapia K, Romero-Palacios N, Arcos-Zavala R. 2007. Suplemento alimenticio de alto contenido proteico para niños de 2.5 años. Desarrollo de formulación y aceptabilidad. *Interciencia* 32:857-864.

Chacón-Lee TL, González-Mariño GE. 2010. Microalgae for “Healthy” Foods Possibilities and Challenges. *Comprehensive Reviews in Institute of Food Technology* 9:655-675.

Chen M, Tang H, Hongzhi M, Holland TC, NG SK, Salley S. 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the Green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* 102(2):1649-1655.

Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294-306.

Chojnacka K, Marquez RFJ. 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology* 3(1):21-34.

Christenson LB, Sims RC. 2012. Rotating algal biofilm reactor and spool harvester for wastewater treatment with biofuels byproducts. *Biotechnology and Bioengineering* 109(7):1674-1684.

- Cofrades S. 2013.** Design of Healthier Foods and Beverages Containing Whole Algae. En: "Functional Ingredients from Algae for Foods and nutraceuticals". 19^a ed. Dominguez H (ed.). Elsevier. New York, NY, EUA. p 633.
- Corbo MR, Bevilacqua A, Petruzzi L, Casanova FP, Sinigaglia M. 2014.** Functional beverages: The emerging side of functional foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 13:1192-1206.
- Croizer A, Clifford MN, Ashihara H. 2006.** Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. p 353.
- Diamantini G, Pignotti S, Antonini E, Chiarabini A, Angelino 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.
- Dragone G, Fernandes B, Vicente AA, Teixeira JA. 2010.** Third generation biofuels from microalgae. 2^a ed. Portugal: Formatex Research Center. p 1366.
- Díaz CV, Ordoñez OC. 2006.** Evaluación del pH y la agitación del medio mas adecuada para el crecimiento de *Dunaliella salina* en condiciones de laboratorio [Tesis de licenciatura]. Bogotá, Distrito Capital, Colombia: Universidad Javeriana. p 84.
- 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.

- Doyon M, Labrecque JA. 2008.** Functional foods: a conceptual definition. *British Food Journal* 110(11):1133-1149.
- Ebenezer V, Ki JS. 2013.** Quantification of toxic effects of the herbicide metolachlor on marine microalgae *Ditylum brightwelli* (*Bacillariophyceae*), *Prorocentrum minimum* (*Dinophyceae*), and *Tetraselmis suecica* (*Chlorophyceae*). *Journal Microbiology* 51(1):136-139.
- 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 3 agosto de 2015.
- Ehiazé AE, Sean C, Shifa S, Carrington G. 2009.** Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol co-digested microalgae biomass. *GCB Bioenergy* 1:371-381.
- EI-Baky HH, El Baz FK, El Baroty GS. 2008.** Evaluation of marine algae *Ulva lactuca* L. As a source of natural preservative ingredient. *Amer-Eurasian Journal Agricultural Environment Sciences* 3:434-444.
- Euromonitor International. 2013.** Soft Drinks in Mexico. Euromonitor. Disponible de: <http://www.euromonitor.com>. Revisado el 24 marzo de 2014.
- Fábregas J, Patiño M, Arredondo-Vega BO, Tobar JL, Otero A. 1995.** Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat culture of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Applied Microbiology Biotechnology* 44:287-292.
- FAO. 2014.** Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture.

Food and Agriculture Organization (FAO) Corporate Document Repository.

Disponible en: <http://www.fao.org>. Revisado el 12 noviembre de 2014.

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

Fennema OR. 2001. Química de los alimentos. 2ª ed. Zaragoza, España: Editorial Acribia. p 1258.

Fernández-Linares LC, Montiel-Montoya J, Millán-Oropeza A, Badillo-Corona A. 2012. Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai* 8(3):101-115.

Fleurence J. 1999. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science Technology* 10(1):25-28.

Floegel A, Kim DO, 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.

Fradique M, Batista AP, Nuñez MC, Gouveia L, Bandarra NM, Raymundo A. 2010. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. *Journal Science Food Agriculture* 90:1656-1664.

Francavilla M, Kamaterou P, Intini S, Monteleone M, Zabaniotou A. 2015. Cascading microalgae biorefinery: Fast pyrolysis of *Dunaliella tertiolecta* lipid extracted-residue. *Algal Research* 11:184-193.

Francavilla M, Trotta P, Luque R. 2010. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. *Bioresource*

Technology 101:4144-4150.

Frikha F, Kammoun M, Hammami N, Mchirgui R, Belbahri L, Gargouri Y, Miled N, Ben-Rebah F. 2011. Composición química y algunas actividades biológicas de algas marinas recolectadas en Túnez. *Ciencias del Mar* 37(2):113-124.

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

Garofalo R. 2011. Energy: Taxonomy, Biology and Biotechnology. *AquaFuels* [Serie en línea]. 258 p. Disponible de [<http://www.aquafuels.eu>]. Publicado el 20 de mayo de 2011.

Garson MJ. 1993. The bio synthesis of marine natural products. *Chemistry Reviews* 93(5):1699-1733.

Garzón-Sanabria AJ, Davis RT, Nikolov ZL. 2012. Harvesting *Nannochloris oculata* by inorganic electrolyte flocculation: Effect of cell density, ionic strength, coagulant dosage, and media pH. *Bioresource Technology* 118:418-424.

Gironés-Vialplana A, Vlentáo P, Andrade PB, Ferreres F, Moreno DA, García-Viguera C. 2015. Beverages of lemon juice and exotic noni and papaya with potential for anticholinergic effects. *Food Chemistry* 170:16-21.

Godoy-Hernández G, Vázquez-Flota FA. 2006. Growth measurements. Estimation of cell division and cell expansion. En: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota FA (Eds.). *Methods in Molecular Biology. Plant Cell Culture Protocols*. Vol. 318. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. p 51-58.

- 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.
- Goiris K, Coles 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.
- Gouveia L, Raymundo A, Batista A, Sousa I, Empis J. 2006.** *Chorella vulgaris* and *Haematococcus pluvalis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research and Technology* 222:362-367.
- Gouveia L, Batista A, Miranda A, Empis J, Raymundo A. 2007.** *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8:433-436.
- Gouveia L. 2014.** From Tiny Microalgae to Huge Biorefineries. *Oceanography* 2(1):1-8.
- Gotham I, Rhee G. 1982.** Effects of nitrate and phosphate limitation on cyclostat growth of two freshwater diatoms. *Journal of General Microbiology* 128:199-205.
- Gruenwald J. 2009.** Novel botanical ingredients for beverages. *Clinics in Dermatology* 27:210-216.
- Gualtieri P, Barsanti L, Passarelli V. 1988.** Chitosan as flocculant for concentrating *Euglena gracilis* cultures. *Annal Institute Pasteur/Microbiology* 139:717-726.
- Gudin C, Thepenier C. 1989.** Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *Advance Biotechnology Processes* 6:73-110.

- Guedes AC, Amaro MH, Malcata FX. 2011a.** Microalgae as sources of Carotenoids. *Marine Drugs* 9(4):625-644.
- Guedes AC, Amaro HM, Barbosa CR, Pereira RD, Malcata FX. 2011b.** Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International* 44(9):2721-2729.
- Guedes AC, Amaro HM, Giào MS, Malcata X. 2013.** Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. *Food Chemistry* 138:638-643.
- Guedes AC, Amaro HM, Sousa-Pinto I, Malcata FX. 2014.** Applications of Spent Biomass. En: Pandey A, Lee DJ, Chisti Y, School C (eds.). *Biofuels from Algae*. New York: Elsevier. p 205-220.
- 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.
- Guillard RR, Ryther JH. 1962.** Studies on marine planktonic diatoms *I. Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gram. *Canadian Journal of Microbiology* 8:229-239.
- Guiry MD y Guiry GM. 2008.** AlgaeBase. World-wide electronic publication: National University of Ireland, Galway. Disponible de: <http://www.algaebase.org>. Consultado el 19 agosto de 2014.
- 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.

Hasler CM. 2002. Functional foods: Benefits, concerns and challenges- A position paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of Nutrition* 132:3772-3781.

Hemalatha A, Girija K, Parthiban C, Saranya C, Anantharaman P. 2013. Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom, *Navicula clavata* and Green microalgae, *Chlorella marina* and *Dunaliella salina*. *Advances in Applied Science Research* 4(5):151-157.

Hernández-Brenes C, Serna-Saldívar S. 2003. Alimentos nutraceuticos, el futuro de nuestra alimentación. *Transferencia [Serie en línea]*. 16(61). Disponible de ITESM: [<http://www.mty.itesm.mx>]. Publicado en Enero del 2003.

Hilliam M. 1996. Functional foods: The Western consumer viewpoint. *Nutrition Reviews* 54:189-194.

Holdt S, Kraan S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal Applied Phycology* 23(3):543-597.

Hosseini AT, Shariati M. 2009. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology* 107:14-35.

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

Ikeda K, Kitamura A, Machida H, Watanabe M, Negishi H, Hiraoka J, Nakano T. 2003. Effect of *Undaria pinnatifida* (Wakame) on the development of

cerebrovascular diseases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 30:44-48.

IM. 2004. Panel on Dietary Reference Intakes for Electrolytes and Water.

Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. National Academy Press. Washington DC, EUA. Disponible en: www.nap.edu. Consultado el 23 de Agosto 2014.

Ismaiel M, El-Ayouty YM, Piercey-Normore M. 2014. Antioxidant characterization in selected cyanobacteria. *Annual Microbiology* 64:1223-1230.

Jacobsen J. 2015. “2015 New Product Development Outlook”. *Beverage Industry* 106(1):56-65.

Jaramillo-Obando JJ. 2011. Evaluación Tecno-Económica de la producción de Biocombustibles a partir de microalgas. [Tesis de maestría]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. p 115.

Jesus-Raposo MF, Costa de Morais RM y Bernardo de Morais AMM. 2013. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences* 93:479-486.

Jones CS y Mayfield SP. 2012. Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. *Current Opinion in Biotechnology* 23(3):346-351.

Juárez-Montiel M, Ruiloba-León S, Chávez-Camarillo G, Hernández-Rodríguez C, Villa-Tanaca L. 2011. Huitlacoche (*corn smut*), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista Iberoamericana de Micología* 28(2):69-73.

Khalifa FAB. 2013. B-Carotene production by the marine microalgae *Dunaliella*

tertiolecta and *D. salina* in batch cultivation. *Minia Science Bulletin* 24(2):1-9.

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

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 K, Jung JY, Kwon JH, Yang JW. 2015a. Dynamic microfiltration with a perforated disk for effective harvesting of microalgae. *Journal of Membrane Science* 475:252-258.

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

Koller M, Salerno A, Tuffner P, Koinigg M, Böchzelt, 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.

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

Kotilainen L, Rajalahti R, Ragasa C, Pehu E. 2006. Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. *Agriculture and Rural Development Discussion Paper* 30:1-82.

- KPMG International. 2015.** Nutraceuticals: The future of intelligent food.
Disponible de: www.KPMG.com. Revisado el 12 de Marzo del 2013.
- Larkum AWD, Ross IL, Kruse O, Hankamer B. 2011.** Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. Trends in Biotechnology 30(4):198-205.
- Lee RE. 2008.** Phycology. 4^a ed. New York: Cambridge University Press. p 534.
- Lee E, Heng RL, Pilon L. 2013a.** Spectral optical properties of selected photosynthetic microalgae producing biofuels. Journal Quantitative Spectroscopy Radiative Transfer 114:122-135.
- Lee OK, Kim AL, Seong DH, Lee CG, Jung YT, Lee JW, Lee EY. 2013b.** Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga *Dunaliella tertiolecta*. Bioresource Technology 132:197-201.
- Lewis LA y McCourt RM. 2004.** Green Algae and the origin of land plants. American Journal of Botany 91:1535-1556.
- Li Q, Du W, Liu D. 2008.** Perspectives of microbial oils for biodiesel production. Applied Microbiology and Biotechnology 80:749-756.
- Liu J, Tao Y, Wu J, 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.
- Loaiza-Nayar SG. 2010.** Estudio nutricional y alternativas de uso del huitlacoche (*Ustilago maydis*) desecado en deshidratador solar. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. p 36.

- Lodi A, Binaghi L, Faveri D, Carvalho J, Converti A. 2005.** Feb-batch mixotrophic cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis (Cyanophyceae)* with carbon source pulse feeding. *Ann. Microbiology* 55(3):181-185.
- 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-Elías JA, Fimbre-Olivarría D, Medina-Juárez LA, Miranda-Baeza A, Martínez-Córdova LR, Molina-Quijada DMA. 2013.** Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. *Phyton* 82:23-30.
- López A, Rico M, Rivero A, Suárez MT. 2011.** The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry* 125:1104-1109.
- López-Elías JA, Fimbres-Olivarría D, Medina-Juárez LA, Mirando-Baeza A, Martínez-Córdova LR, Molina-Quijada DMA. 2013.** Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. *International Journal of Experimental Botany* 82:23-30.
- Luana N, Rossana C, Curiel JA, Kaisa P, Marco G, Rizello CG. 2014.** Manufacture and characterization of a yogurt-like beverage made with oat flakes fermented by selected lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 185:17-26.
- Maadane A, Merghoub N, Ainane T, El Arroussi H, Benhima R, Amzazi S, Bakri Y, Wahby I. 2015.** *Journal of Biotechnology* 215:13-19.
- Machu L, Misurcova L, Vavra JA, Orsavova J, Mlcek J, Sochor J, Jurikova T.**

- 2015.** Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules* 20:1118-1133.
- Makinen-Aakula M. 2006.** Trends in functional foods dairy market. In Proceedings of the third functional food net meeting. Liverpool, UK.
- Marxen K, Vanselow KH, Lippemeirer 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.
- Magalhães 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.
- Mclachlan J. 1973.** Growth-media-marine. En *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurement*. Ed. Stein, JR. London: Cambridge University Press. p 22-51.
- Medina-Jasso A, Piña-Valdez P, Nieves-Soto M, Arzola-González JF, Guerrero-Ibarra M. 2012.** La importancia de las microalgas. *CONABIO BioDiversitas* 103:1-5.
- 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 and Developmental Biology Plant* 45:740-749.
- Milán-Carillo 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.

Milledge J. 2010. The challenge of algal fuel: economic processing of the entire algal biomass. *Materials Engineering Newsletter* 1(6):4-6.

Milledge J. 2011. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Review Environment Science Biotechnology* 10: 31-41.

Molina E, Acien F, Robles Y. 2003. Recovery Of Microalgal Biomass and Metabolites: Process Options and Economics. *Biotechnology Advances* 20:491-515.

Montgomery DC. 1991. Diseño y Análisis de experimentos. 2ª ed. México, DF: Limusa Wiley. p 681.

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. p 110.

Mora-Escobedo R, Paredes-López O, Gutiérrez-López GF. 1994. Effect of germination on the rheological and functional properties of amaranth sedes. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie* 24:241-146.

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

- Moreno-Montoro M, Olalla-Herrera M, Gimenez-Martinez R, Navarro-Alarcón M, Rufián-Henares JA. 2015.** Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis* 38:19-26.
- Ninfali P, Chiarabini A, Angelino D. 2014.** The ORAC/kcal ratio qualifies nutritional and functional properties of fruit juices, nectars, and fruit drinks. *Food Science and Nutrition* 65(4):708-712.
- Ochoa C y Ayala A. 2004.** Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos. *Ingeniería y Competitividad. Revista de Ingeniería y Competitividad: Divulgación del Desarrollo Científico y Tecnológico* 6(2):93-104.
- Olsen NJ, Heitmann BL. 2008.** Intake of calorically sweetened beverages and obesity reviews 10:68-75.
- 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.
- Oren A. 2005.** Review A hundred years of Dunaliella research: 1905-2005. *Saline Systems* DOI: doi:10.1186/1746-1448-1-2.
- Oxfam. 2013.** México es ya el Mayor Consumidor de Refresco en el Mundo. México: Oxfam International. Disponible de: <http://site.oxfamMexico.org>. Consultado el 2 de Abril de 2014.
- 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 11:42-48.

Packaged Facts. 2011. Functional and natural ready to drink beverages in the U.S. Pub ID: LA2806017. Disponible de: <http://www.packagedfacts.com>. Consultado el 3 de Abril de 2014.

Parametría. 2012. Investigación Estratégica Análisis de Opinión y Mercado. México país refresquero. Estrategia 360. Disponible de: www.parametria.com.mx. Consultado el 26 de Marzo de 2014.

Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Grighenti F. 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages, and oils consumed in Italy assessed by three different In Vitro Assays. The Journal of Nutrition 133:2812-2819.

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

Pérez JJ. 2007. Metodología para la evaluación de ingrediente funcionales antioxidantes: efectos de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. [Tesis Doctoral]. Madrid, España: Universidad Autónoma de Madrid. Faculta de Ciencias, Departamento Química Física Aplicada.

Pérez-Leonard H. 2006. Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. Revistas Científicas de América Latina 40(3):20-28.

Pienkos P y Darzins A. 2009. The Promise and Challenges of Microalgal-

derived Biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefinery* 3:431-440.

Pierpoint WS. 2000. Why do plants make medicines. *Biochemistry* 22:37-40.

Pisoschi 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, Willett WC. 2006. A new proposed guidance system for beverage consumption in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition* 83:529-42.

Popkin BM, Nielsen SJ. 2003. The sweetening of the world's diet. *Obesity Research* 11:1325-1332.

Posten C y Schaub G. 2009. Microalgae and biomass as source for fuels- A process view. *Journal Biotechnology* 142(1):64-69.

Preetha K, John L, Sukumaran CS, Kizhakkedath KV. 2012. Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian Salinas and their diversity. *Aquatic Biosystems* 8:27.

Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:4290-4302.

Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G, Mainland MC. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(7):2686-2693.

Priyadarshani I, Rath B. 2012. Commercial and industrial applications of

- microalgae- A review. *Journal of Algal Biomass Utilization* 3(4):89-100.
- Pulz O, Gross W. 2004.** Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology* 65:635-648.
- Pumas P, Pumas C. 2014.** Proximate composition, total phenolics content and antioxidant activities of microalgal residue from biodiesel production. *Maejo International Journal of Science and Technology* 8(2):122-128.
- Ramos-Suárez JL, Carreras N. 2014.** Use of microalgae residues for biogas production. *Chemical Engineering Journal* 242:86-95.
- Ramírez A, Pacheco ED. 2009.** Propiedades funcionales de harinas altas en fibra dietética obtenidas de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia* 34(4):293-298.
- Repo de Carrasco RC, Encima ZCR. 2008.** Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y Kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Revista Sociedad Química del Perú* 74:85-99.
- 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(9/10):1231-1237.
- Reyes-Moreno C, Arguelles-López OD, Rochín-Medina JJ, Milán-Carrillo J, Rivera-López J, Valdez-Ortiz A, López-Valenzuela JA, Gutiérrez-Dorado R. 2012.** High Antioxidant Activity Mixture of Extruded Whole Quality Protein Maize and Common Bean Flours for production of a Nutraceutical beverage Elaborated with a Traditional Mexican Formulation.

Plant Foods for Human Nutrition 67(4):450-456.

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

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(3):61-77.

Ribeiro-Rodrigues LH, Arenzon A, Raya-Rodriguez MT, Fontoura NF. 2011. Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicelular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 3(8):225-228.

Richardson A y Fedoroff S. 2001. Quantification of cells in culture. En *Protocols for Neural Cell Culture*. Fedoroff S, Richardson A. (Eds) 3^a ed. Totowa, NJ: Humana press Inc. p 333-339.

Richelle M, Tavazzi I, Offord E. 2001. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (Coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *Journal Agriculture Food Chemistry* 49:3438-3442.

Richmond A. 2004. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Australia: Blackwell Science. p 545.

Rivera A, 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. Boletín Medico del Hospital Infantil de México (26):208-237.

Rochín-Medina JJ. 2011. Bebidas con potencial nutracéutico a partir de mezclas de harinas precocidas [Tesis de maestría]. Sinaloa, México: Universidad Autónoma de Sinaloa. p 138.

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(1):51-65.

Rodríguez-García I y 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.

Rodríguez EM, Steffolania E, Martínez CS, León AE. 2014. Effects of Spirulina biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. Food Science and Technology 58:102-108.

Rojan PJ, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A. 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source of bioethanol. Bioresource Technology 102:186-193.

Rolls BJ y Bell EA. 1999. Water incorporated into a food but not served with a food decreases energy intake in lean women. American Journal of Clinical Nutrition, 70(4):448-55.

Rolls BJ y Fedoroff IC. 1990. Foods with different satiating effects in humans. Appetite 15(2):115-26.

- Romero TL y Ferrán CG. 2001.** Flocculación de *Chrorella sp.* con la utilización de quitosana. *Revista de Investigación Marina* 22:57-62.
- Ryckebosch E, Bruneel C, Termote-Verhalle R, Goiris K, Muylaert K, Foubert I. 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.
- Salazar-Pérez EL. 2012.** Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel [Tesis de licenciatura]. Perú: Universidad de Pirhua. p 117.
- Salim S, Bosma R, Vermuë MH, Wijffels RH. 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: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology. Food Research International* 48:948-960.
- Santos-Ballardo DU, Font-Segura X, Sánchez-Ferrer A, 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 and Research* 33(3):250-257.
- Santos-Ballardo DU, Rossi S, Hernández V, Vázquez RG, Rendón-Unceta MC, Caro-Corrales J, Valdez-Ortiz A. 2015b.** A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalga species in aquaculture. *Aquaculture* 448:87-92.
- Saranya C, Hmalatha A, Parthiban C, Ananatharaman P. 2014.** Evaluation of

antioxidant properties, total phenolic and carotenoid content of *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella salina* and *Isochrysis galbana*. International Journal of Current Microbiology and Applied Science 3(8):365-377.

Satyanarayana K, Mariano A, Vargas J. 2011. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. International Journal of Energy Research 35:291-311.

Schenk P, Thomas-Hall S, Stephens E, Marx U, Mussnug J, Posten C, Kruse

O, Hankamer B. 2008. "Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. Bioenergy Resource 1:20-43.

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 28 de Marzo de 2014.

Shahidi F, Weerasinghe DK. 2004. Nutraceuticals beverages. 1ª ed. Washington: American Chemical Society Publication. p 147.

Sierra E, Acien FG, Fernandez JM, García JL, Gonzalez C, Molina GE. 2008. Characterization of a flat plate photobiorreactor for the production of microalgae. Chemical Engineering Journal 128:136-147.

Silencio JL. 2006. Nutracéuticos. Nutri Informato 11(4):11-12.

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.
- Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. 2008.** Functional Food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review *Appetite* 51:456-467.
- Sloan AE. 2015.** The Top Ten Food Trends. IFT feeding the minds that feed the world 69(4): 1-25.
- 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.
- Sommer T, Morrissy N, Potts W. 1991.** Growth and pigmentation of marron (*Cherax tenuimanus*) fed a reference ration supplemented with the microalga *Dunaliella salina*. *Aquaculture* 99:285-295.
- 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 solventes. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13(3):723-737.
- Spence JT. 2006.** Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:4-6.

- Spolaore P, Joannis CC, Duran E, Isambert A. 2006.** Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2):87-96.
- Sydney EB, Sturm W, De Carvalho JC, Thomas-Soccol V, Larroche C, Pandey A, Soccol CR. 2010.** Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology* 101:5892-5896.
- Suzuki N, Fujimura A, Nagai T, Mizumoto I, Itami T, Hatate H, Nozawa T, Kato N, Nomoto T, Yoda B. 2004.** Antioxidative activity of animal and vegetable dietary fibers. *Biofactors* 21(14):329-333.
- Tang H, Abuunasser N, Garcia MED, Chen M, Simon NKY, Salley SO. 2011.** Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feed stock for biodiesel. *Applied Energy* 88:3324-3330.
- Teratanavat R, Hooker NH. 2006.** Consumer valuations and preference heterogeneity for a novel functional food. *Journal of Food Science* 71:533–541.
- Tibbetts SM, Whitney CG, MacOheron MJ, Bhatti S, Banskota AH, Stefanova R, McGinn PJ. 2014.** Biochemical characterization of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal feed applications. *Algal Research* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.11.011>. p 436-447.
- Tibbetts SM, Bjornsson WJ, McGinn PJ. 2015a.** Biochemical composition and amino acid profiles of *Nannochloropsis granulata* 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.

Torres RE. 2011. Reportaje Anual de Bebidas. Industria Alimenticia. BNP Media: Industria Alimenticia. Disponible de: <http://www.industriaalimenticia.com>.

Consultado el 3 de Abril de 2014.

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 of Polymers and the Environment* 21:944-951.

Tuan ZH, Mohd FY, Shamzi MM, 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(21):5971-5878.

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 Acadeies. Washington, DC, EUA: National Academies Press. p 1330.

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

publications. p 4.

Vasanti SM, Frack BH. 2011. Sugar-sweetened beverages and health: where

does the evidence stand?. *American Journal of Clinical Nutrition* 94:1161-1162.

Venkatesan S, Senthil MS, Senthil C, Bhaskar S, Rengasamy R. 2013.

Culturing marine green microalgae *Dunaliella salina* Teodo and *Dunaliella*

tertiolecta Masjuk in Dewalne's medium for valuable feeds stock. Journal of Modern Biotechnology 2(2):40-45.

Walter M, Marchesan E. 2011. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Rice. Brazilian Archives of Biology and Technology 54(1):371-377.

Wang B, Li Y, Wu N, Lan CQ. 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. Applied Microbiology Biotechnology 79:707-718.

Whyte AR, Williams CM. 2015. Effects of a single dose of a flavonoid-rich blueberry drink on memory in 8 to 10 years old children. Nutrition 31:531-534.

Williams P y Laurens L. 2010. Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: Review: 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.

Zhao B, Ma J, Zhao Q, Laurentes 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.

ABREVIATURAS

<u>a</u>	Parámetro Hunter-Lab
ADA	American Diabetes Association
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Aw	Actividad de agua
<u>b</u>	Parámetro Hunter-Lab
bs	Base seca
Ca _{ox}	Capacidad Antioxidante
cal	Caloría
cél	Células
cm	Centímetro
col	Colaboradores
CBR	Concentración de biomasa residual
CFT	Compuestos fenólicos totales
CS	Concentración de saborizante
°C	Grados centígrados
DO	Densidad óptica
t_d	Tiempo de duplicación
Ed	Editores
ET	Equivalentes de Trólox
EAG	Equivalentes de ácido gálico
FAO	Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas

FDA	Food and Drug Administration
FO	Formulación optimizada
g	Gramos
GRAS	Generally Regarded as Safe
h	Hora (s)
kcal	Kilocaloría (s)
Kg	Kilogramo
L	Litro
<u>L</u>	Parámetro Hunter-LAb
M	Molar
mg	Miligramo
Mm	Milimolar
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
nm	Nanómetro (s)
μM	Micromolar
μg	Microgramo
NaCl	Cloruro de sodio
ND	No determinado
NP	No presente
p	Nivel de significancia
Pág	Página
pH	Potencial hidrógeno

p	Páginas publicadas
p/v	Relación peso-volumen
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundo
T	Temperatura
t	Tiempo
USDA	U.S. Department of Agriculture
WHO	Organización Mundial para la Salud
μ	Tasa de crecimiento específico