



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER  
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**Caracterización analítica de microalgas para su  
uso en bebidas isotónicas**

**Autor: Aldo Brunetti**

**Tutor: Antonio Zapardiel Palenzuela**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS**

**FEBRERO, 2024**

## RESUMEN

Las microalgas son microorganismos unicelulares que son capaces de generar biomasa orgánica a partir de CO<sub>2</sub> y luz, usando el agua como dador de electrones, oxidándola a O<sub>2</sub>.

Las microalgas son ricas en vitaminas principalmente del grupo B, aminoácidos, ácidos grasos poliinsaturados y ricas sobre todo en compuestos bioactivos como los antioxidantes.

El trabajo se centró en cultivar algunas microalgas entre las cuales está la *Arthrospira platensis*, que es rica en ficocianina. También se han cultivado otras microalgas como *Haematococcus pluvialis* y *Chlorella vulgaris*. Además, el trabajo se ha centrado en el estudio de la extracción de la ficocianina y posterior utilización en el desarrollo de formulaciones tanto de nuevos geles como de bebidas isotónicas.

La ficocianina se ha extraído por lisis celular por osmosis siendo uno de los métodos menos caros hoy en día. Eso no excluye poder optimizar el método de extracción poniendo en práctica las técnicas verdes como SFE (fluidos supercríticos con CO<sub>2</sub>) o PLE (fluidos presurizados) o también por ultrasonidos; las cuales son especialmente respetuosas con el medio ambiente.

Se ha demostrado la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a través del método de DPPH. Asimismo, se ha evaluado tanto el rendimiento lipídico como la concentración de *H. pluvialis*, *C. vulgaris* y *A. platensis* utilizando el método de Folch, seguido del análisis de la concentración lipídica mediante GC-MS.

Utilizando *A. platensis* y ficocianina se han formulado diversas combinaciones tanto de geles como de bebidas isotónicas, mezclando distintos sabores y concentraciones de azúcares, con el fin de desarrollar una bebida/gel con alta aceptación.

**Palabras claves:** *Arthrospira platensis*, ficocianina, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, lisis celular, HPLC/MS, método Folch, DPPH, formulación.

## ABSTRACT

Microalgae are unicellular microorganisms capable of generating organic biomass from CO<sub>2</sub> and light, using water as an electron donor and oxidizing it into O<sub>2</sub>. They are rich in vitamins, primarily from the B group, amino acids, polyunsaturated fatty acids, and especially abundant in bioactive compounds such as antioxidants.

The focus of the work was on cultivating specific microalgae, including *Arthrospira platensis*, known for its richness in phycocyanin. Other microalgae like *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella vulgaris* have also been cultivated. Furthermore, the work has focused on studying the extraction of phycocyanin and its subsequent use in the development of formulations for both new gels and isotonic beverages.

Phycocyanin has been extracted through cell lysis by osmosis, considered one of the least expensive methods today. However, it's possible to optimize the extraction method by implementing green techniques such as SFE (Supercritical Fluid Extraction with CO<sub>2</sub>), PLE (Pressurized Liquid Extraction), or ultrasound, which are particularly environmentally friendly.

The antioxidant capacity of the extracts obtained through the DPPH method has been demonstrated. Additionally, the lipid yield and concentration of *H. pluvialis*, *C. vulgaris*, and *A. platensis* were evaluated using the Folch method, followed by lipid concentration analysis through GC-MS.

Using *A. platensis* and phycocyanin, various combinations of gels and isotonic beverages have been formulated, mixing different flavors and sugar concentrations to develop a highly accepted beverage/gel.

**Key words:** *Arthrospira platensis*, phycocyanin, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, cell lysis, HPLC/MS, Folch method, DPPH, formulation.

## Abreviaturas y Acrónimos

- Abs: Absorbancia
- ALA: Ácido alfa-linoleico
- AGL: Ácidos grasos libres
- *A.platensis*: *Arthrospira platensis*
- BCAA: Aminoácidos ramificados
- CTC: Concentración total de carotenoides
- *C.vulgaris*: *Chlorella vulgaris*
- DAD: Detector de haz de fotodiodos
- DAG: Diacilglicéridos
- DHA: Ácido docosahexaenoico
- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- EPA: Ácido eicosapentaenoico
- ELSD: Detector de dispersión de luz por evaporación
- FAME: Metil éster de ácido graso
- GL: Glucolípido
- GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
- HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia
- *H. pluvialis*: *Haematococcus pluvialis*
- LPC: Lisofosfatidilcolina
- MTBE: Metil tert-butil éter
- PBR: Fotobiorreactor
- PC: Fosfatidilcolina
- PUFA: Ácido graso poliinsaturado
- rpm: Revoluciones por minuto
- RT: Tiempo de retención
- SD: Desviación estándar
- TAG: Triacilglicérido
- THF: Metiltetrahidrofurano

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pasos en el procesamiento de la espirulina _____	5
Figura 2. A,B) Imágenes de contraste de fase representativas de <i>Arthrospira platensis</i> (AP) sin fijar. (C) Proyección ortogonal de una pila de imágenes tridimensionales de microscopía de barrido láser (47 imágenes individuales) de AP. Microscopía de barrido láser sin etiquetas de una muestra sin fijar. La muestra se emitió a una longitud de onda de 555 nm. Las emisiones se detectaron entre 650 nm y 700 nm. (D) Imagen en modo transmitido de la misma posición. Las imágenes se tomaron a 100 aumentos primarios con un Axio Observer.Z1/7 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania). Tomada de <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33513794/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33513794/</a> _____	6
Figura 3. Estructura de la ficocianina (PC). (A) Estructura cristalina de la PC de la cianobacteria <i>S. platensis</i> en forma de hexámero, imagen de PDB ( <a href="http://www.rcsb.org">http://www.rcsb.org</a> ) de PDB ID 1GH0 (2011). (B) Representación esquemática del ensamblaje de la PC. Se compone de dos subunidades proteicas, cadenas $\alpha$ y $\beta$ , una ficocianobilina (PCB) está unida a la subunidad $\alpha$ y dos PCB están unidas a la subunidad $\beta$ . (C) Estructura química de la PCB, el cromógeno responsable del color azul de la PC. _____	11
Figura 4. Escalado de <i>A. platensis</i> en matraz tipo Erlenmeyer desde 250 mL a 2000 mL. Tomada por Algaloop SL _____	22
Figura 5. Fotobiorreactores de 100 L en los que se ha escalado de cultivo y adaptado a condiciones de luminosidad y temperatura para las tres especies de microalgas. tomada por Algaloop SL _____	22
Figura 6. Imagen al microscopio de a) <i>A. platensis</i> donde se aprecia la última estructura de los tricomas de las células, b) <i>C. sp.</i> y c) <i>H. pluvialis</i> donde se visualiza la acumulación de astaxantina color rojo en las células. (tomada por AlgaeBase, National University of Ireland, Galway) _____	23
Figura 7. Evolución de la concentración de biomasa con el tiempo en el cultivo discontinuo _____	27
Figura 8. Productividad de biomasa ( $P_b$ ) máxima y mínima alcanzada para los distintos medios de cultivo ensayados: laboratorio (Jordan) y escalado (Zarrouk) _____	28
Figura 9. Evolución de la concentración de biomasa con el tiempo en el cultivo semicontinuo _____	28
Figura 10. Velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu$ máxima) para las distintas microalgas cultivadas en semicontinuo _____	29
Figura 11. Análisis mediante el método DPPH de la muestra de ficocianina _____	31
Figura 12. Rendimiento de la <i>A. platensis</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>H. pluvialis</i> _____	32
Figura 13. Contenido en carotenoides totales (CTC) y clorofilas en la muestra de espirulina y en la muestra de <i>C. vulgaris</i> . _____	35
Figura 14. Diagrama de flujo de la producción de la bebida _____	36
Figura 15. Diagrama de flujo del proceso de producción del gel deportivo _____	37
Figura 16. Fotografía de los sets de bebidas y geles distribuidos entre los participantes _____	38
Figura 17. Bebidas elaboradas con espirulina _____	42

Figura 18. Bebidas elaboradas con ficocianina _____	42
Figura 19. Bebidas de ficocianina sin tratamiento térmico (izquierda) y con diferentes tratamientos térmicos (centro y derecha) _____	43
Figura 20. Gráfico de medias de datos de aceptación, JAR de sabor y JAR de dulzor de los prototipos de bebidas evaluadas _____	51
Figura 21. Gráfico de medias y desviación de la aceptación de los diferentes prototipos de bebidas deportivas _____	52
Figura 22. Gráfico de medias de datos de aceptación, JAR de sabor, JAR de textura y JAR de dulzor de los prototipos de geles evaluados _____	54
Figura 23. Gráfico de medias y desviación de la aceptación de los diferentes prototipos de geles deportivos _____	54

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de absorbancia a pH7 de la <i>A.platensis</i> _____	30
Tabla 2. Resultados de la extracción de lípidos por GC-MS de <i>H. pluvialis</i> (método 175b 1,5 ml/min split 1 10 agilent) _____	32
Tabla 3. Resultados de la separación de lípidos por GC-MS de la <i>C. vulgaris</i> (método 175b 1,5 ml/min split 1 10 agilent) _____	33
Tabla 4. Resultados de la separación de lípidos por GC-MS de la <i>A.platensis</i> (Método 175B 1,5 ml/min split 1 10 agilent) _____	33
Tabla 5. Composición nutricional de <i>A. platensis</i> _____	34
Tabla 6. Aromas dulces, cítricos y frescos obtenidos durante la sesión de ideación con los chef40	
Tabla 7. Ventajas e inconvenientes de <i>A. platensis</i> y ficocianina _____	41
Tabla 8. Fórmula bebida cassis-vainilla _____	44
Tabla 9. Fórmula bebida naranja _____	45
Tabla 10. Fórmula bebida melocotón-menta _____	45
Tabla 11. Fórmula gel manzana-lima _____	46
Tabla 12. Fórmula gel limón _____	46
Tabla 13. Composición de azúcares de las bebidas madre y variantes de sabor, y geles madre y variantes de sabor _____	49
Tabla 14. pH de las bebidas madre y variantes de sabor, y geles madre y variantes de sabor _____	49
Tabla 15. Coordenadas CIELAB de color de las bebidas madre y variantes de sabor y geles madre y variantes de sabor _____	50
Tabla 16. Porcentaje de acidez total (g-ácido/100ml) _____	50
Tabla 17. Sólidos solubles totales (°brix) de las bebidas madre y variantes de sabor y geles madre y variantes de sabor _____	50
Tabla 18. Medias y p-valores resultantes del análisis de datos de aceptación JAR (Just-About-Right) de sabor y JAR de dulzor de los prototipos de bebidas evaluados resultante del análisis Anova y Turkey _____	51
Tabla 19. Medias y p-valores resultantes del análisis de datos de aceptación JAR de sabor, JAR de dulzor y JAR de textura de los prototipos de geles deportivos evaluados resultante del análisis Anova y Turkey _____	53

# ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
Abreviaturas y Acrónimos	0
INDICE DE FIGURAS	0
INDICE DE TABLAS	0
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características de las microalgas	1
1.2 Características de la <i>Arthrospira platensis</i>	3
1.3 Propiedades de la <i>Arthrospira platensis</i>	7
1.4 Aplicaciones en alimentos	9
1.5 Contenido y perfil de proteínas en <i>A. platensis</i>	10
1.6 <i>A. platensis</i> como fuente de ficocianina	11
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	14
3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	15
3.1 Extracción por método tradicional Folch	15
3.2 Disolventes considerados de base verde para la extracción de carotenoides.	15
3.3 Lisis celular y PLE para extracciones	16
4. EXPERIMENTAL	18
4.1 Equipos	18
4.2 Materiales y otros aparatos	18
4.3 Reactivos	19
4.4 Microalgas y componentes utilizados	19
4.5 Procedimientos en el cultivo de microalgas	20
4.6 Obtención del extracto de ficocianina	24
4.6.1 Método de Folch	24
4.7 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos	25
4.7.1 Determinación del contenido total de carotenoides	25
4.8 Análisis por HPLC-ELSD del contenido de lípidos polares de los extractos	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1 Cinética de crecimiento de las microalgas <i>A. platensis</i> , <i>C. vulgaris</i> y <i>H. pluvialis</i> .	27
5.2 La ficocianina obtenida de <i>A. platensis</i> reduce el DPPH	30



5.3	Análisis bioquímico de las microalgas _____	31
5.4	Formulación preliminar y análisis sensorial de las bebidas y los geles _____	35
5.5	Estudio de aceptación de los geles y bebidas isotónicas. _____	38
5.6	Formulación y desarrollo de bebidas y geles _____	39
5.7	Estudio de la percepción del consumidor de los prototipos desarrollados _____	51
5.8	Pasos a seguir para adaptar los procesos a la Química Verde _____	55
5.9	Perspectivas futuras _____	56
6	CONCLUSIONES _____	57
7	BIBLIOGRAFÍA _____	59
	ANEXO. Cuestionario HUT para la evaluación de bebidas y geles deportivos _____	62

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Características de las microalgas

Las microalgas y las cianobacterias son microorganismos unicelulares que tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis. Son capaces de generar biomasa orgánica a partir de  $\text{CO}_2$  y luz, usando el agua como dador de electrones, oxidándola a  $\text{O}_2$ .

Las microalgas y las cianobacterias difieren en muchos aspectos, especialmente en que las primeras son eucariotas y las segundas son procariotas, pero desde el punto de vista de la ingeniería de procesos, lo relevante es que crecen usando luz como energía y  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono. Por supuesto, tienen requerimientos nutricionales distintos, especialmente teniendo en cuenta que muchas cianobacterias pueden fijar  $\text{N}_2$  (nitrógeno atmosférico), mientras que las microalgas necesitan especies nitrogenadas como nitrato, amonio o aminoácidos.

Las microalgas y las cianobacterias (espirulina) son organismos fotoautótrofos:

- Autótrofos: utilizan una fuente inorgánica de carbono, el  $\text{CO}_2$
- Fotótrofos: utilizan la luz como fuente de energía

Existen también microalgas heterótrofas, que se pueden tratar como cualquier otro organismo, y no necesitan un fotobiorreactor para poder crecer.

Como organismos unicelulares tienen una capacidad de crecimiento y de generación de biomasa mucho mayor que las plantas superiores, ya que no necesitan arraigar o generar estructuras reproductoras, lo que les permite duplicarse en 48 horas.

Las microalgas tienen una composición bioquímica compleja debida a la presencia del aparato fotosintético, que le da una gran riqueza en pigmentos y componentes como citocromos y ácidos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs). Esto resulta en un elevado contenido en productos de alto valor, como los carotenoides, luteína y astaxantina o los PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados), DHA (ácido docosahexaenoico) y EPA (ácido eicosapentaenoico). Estos compuestos bioactivos son muy importantes por el uso que se le puede dar sobre todo en sectores como la biomedicina y la alimentación humana. Además, de ser captadores de  $\text{CO}_2$  y asimiladoras del nitrógeno, son una fuente sostenible de biocombustibles y biofertilizantes.

Las microalgas son capaces de ajustar su composición bioquímica a las condiciones de cultivo. Bajos niveles de N<sub>2</sub> inducen la acumulación de grasas. Elevados niveles de luz aumentan la acumulación de algunos carotenoides y la adición de amonio incrementa el contenido en ficobiliproteínas (ficocianina) en *Arthrospira platensis*. Esta "plasticidad metabólica" no solo favorece la adaptación de las microalgas a los sistemas de cultivo, sino que puede ser explotada para incrementar el contenido en una determinada sustancia y así incrementar la productividad del sistema.

Las microalgas representan una valiosa alternativa para obtener diversos compuestos de alto valor añadido con potenciales aplicaciones en alimentos, nutracéuticos y suplementos alimentarios. Estos pequeños organismos tienen la capacidad de acumular una amplia gama de compuestos beneficiosos para la salud, como lípidos polares, ácidos grasos omega-3 y carotenoides, dependiendo de la especie a la que pertenezcan (Chew, 2017).

Cabe destacar que la composición de estos compuestos puede variar significativamente entre diferentes especies de microalgas e incluso entre distintos cultivos de la misma especie, debido a las condiciones de cultivo utilizadas, las cuales pueden estimular o inhibir la producción de diferentes compuestos durante el crecimiento de las microalgas. *A. platensis* y *C. vulgaris* son las dos microalgas comúnmente más conocidas para su consumo humano, pero con algunas diferencias. Mientras la *A. platensis* es un procarionta, la *C. vulgaris* es un eucariota con las debidas diferencias desde el punto biológico. Además, desde un punto de vista nutricional tanto *C. vulgaris* como *A. platensis*, en porcentaje, tienen los mismos aminoácidos y en proteínas hay una ligera diferencia. Una de las diferencias más grande se encuentra en el grupo de vitaminas B. De hecho *C. vulgaris* es la única en tema de vegetales que contiene la vitamina B12. También tiene una concentración de ácidos grasos omega 3 y 6. (Raposo y col., 2012)

Existe una amplia y detallada bibliografía que investiga los efectos positivos en la salud de compuestos como los ácidos grasos omega-3 y los carotenoides. (Carrasco y col., 2011) Estos últimos son pigmentos orgánicos pertenecientes al grupo de los isoprenoides, y se encuentran comúnmente en organismos fotosintéticos como plantas terrestres, algas, así como en algunos tipos de hongos y bacterias. Se han identificado más de seiscientos carotenoides en la naturaleza, los cuales pueden clasificarse en carotenos y xantofilas, siendo estas últimas derivados oxigenados de los carotenos. Los carotenoides presentan diversas actividades biológicas, siendo las actividades antioxidantes y antiinflamatorias las más destacadas. Por ejemplo, la luteína, una xantofila, se ha estudiado por su efecto antiinflamatorio y su capacidad para proteger contra el estrés oxidativo, lo que resulta beneficioso para la salud cardiovascular. Además, su capacidad para acumularse en la retina y el tejido cerebral se ha relacionado con una disminución del riesgo de desarrollar

degeneración macular asociada a la edad y una protección del cerebro contra el daño oxidativo, lo que favorece una mayor salud neuronal. Por otro lado, otras xantofilas como la fucoxantina se encuentran en menor cantidad en fuentes naturales, pero diversos estudios las han asociado con propiedades biológicas antidiabéticas, antitumorales, hepatoprotectoras, entre otras, lo que demuestra la variedad de carotenoides existentes y sus diferentes actividades biológicas beneficiosas. (Gammone, 2015)

La obtención tradicional de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 se basa en los aceites marinos de pescado y krill, pero este enfoque conlleva problemas de sobreexplotación marina y pesca abusiva. Por tanto, es necesario buscar nuevas fuentes alternativas y sostenibles de ácidos grasos omega-3 bioactivos. Aunque hay especies vegetales que producen ácidos grasos omega-3, principalmente ALA (ácido  $\alpha$ -linoleico), su conversión a formas bioactivas en el organismo es mínima, lo que las descarta como fuentes de omega-3 bioactivo.

Por su parte, las microalgas representan una solución prometedora ya que son la única fuente no animal capaz de producir los ácidos grasos omega-3 bioactivos, EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico). Además, estos microorganismos presentan estos ácidos grasos unidos a lípidos polares, lo que aumenta su valor de bioactividad. Lo más destacable es que las microalgas no dependen de tierras fértiles para su cultivo, ya que pueden crecer en diversos ambientes acuáticos como el mar, aguas dulces, biorreactores en terrenos baldíos o incluso aguas residuales. Su tasa de crecimiento es entre 2 y 3 veces mayor que las plantas terrestres, lo que las convierte en una fuente alternativa de compuestos bioactivos sostenible y respetuosa con el medio ambiente, lo cual es de gran interés en la actualidad. (Chew, 2017).

## 1.2 Características de la *Arthrospira platensis*

La producción de *A. platensis* (también con denominación de espirulina) para consumo humano cuenta con una historia que abarca varios siglos. En el siglo XVI, los conquistadores españoles que arribaron a México hicieron la notable observación de que los aztecas recolectaban espirulina del lago Texcoco con el propósito de crear una suerte de "barra" que servía como una fuente de alimentación para las personas que habitaban en las proximidades (Ciferri & Tiboni, 1985). Además de este ejemplo, se han documentado otros casos alrededor del mundo en los que las personas han empleado este recurso como una valiosa fuente de alimento. En la actualidad, la producción de espirulina puede llevarse a cabo mediante uno de los dos métodos siguientes: el uso de fotobiorreactores cerrados o la crianza en estanques abiertos.

En la producción en los sistemas de cultivo (*raceways*) abiertos, ya sean naturales o artificiales, se presentan ciertas ventajas, como la facilidad de construcción y operación, lo que conlleva una reducción de los costes, aunque a expensas de la tasa de producción. Sin embargo, también se asocian naturalmente una serie de desventajas a este tipo de sistema. Estas incluyen la necesidad de grandes áreas para su implementación, las pérdidas debido a la evaporación, la limitada utilización de la luz por parte de la cianobacteria y una tasa de producción inferior en comparación con otros sistemas, debido a la escasa penetración del aire. Además, la tasa de producción está sujeta a variaciones naturales en las condiciones de temperatura y clima, así como a los niveles fluctuantes de nutrientes en el cuerpo de agua donde se desarrolla la *A. platensis*.

Un fotobiorreactor funciona como un entorno cerrado en el que se pueden regular las condiciones necesarias para la producción de espirulina. Debido a su naturaleza de sistema cerrado, ofrece la ventaja de evitar algunas de las desventajas asociadas con los sistemas abiertos, como la exposición a gases y contaminantes externos. A pesar de que generalmente son más costosos que los estanques abiertos, los fotobiorreactores presentan varias ventajas sobre este tipo de sistemas. Estas incluyen la reducción de las fuentes de contaminación externa, un mayor control sobre las condiciones de producción, como el pH, la temperatura, la luz y la concentración de CO<sub>2</sub>, la prevención de pérdidas debidas a la evaporación, tasas de producción más elevadas y la optimización de las condiciones de luz mediante una distribución más uniforme, lo que minimiza las áreas con iluminación deficiente.

Además, existe un tipo de sistema híbrido que combina las ventajas tanto del fotobiorreactor como de los sistemas de estanque abierto. En este enfoque, se emplea una estructura de tanque abierto que está físicamente cubierto en su superficie para prevenir la exposición a fuentes de contaminación externa y reducir las pérdidas debidas a la evaporación y al CO<sub>2</sub>. (Soni y col., 2017)

La producción mundial de espirulina se lleva a cabo en dos modalidades distintas. Por un lado, está la producción industrializada, que se enfoca en generar materia prima para un mercado interesado en alimentos naturales y saludables, con la posibilidad de su posterior procesamiento para extraer compuestos bioquímicos de alto valor. Por otro lado, la forma más común en las economías en desarrollo consiste en producir espirulina como una fuente de proteína accesible para una amplia parte de la población, en condiciones no ideales y utilizando desechos vegetales y animales en el proceso (FAO, The State of Food and Agriculture, 2019)

El tratamiento de la espirulina tras su recolección abarca las etapas siguientes: filtración y purificación, pre-concentración, concentración, neutralización, descomposición, deshidratación, envasado y almacenamiento (FAO, Food loss index from post-harvest to distribution., 2016).

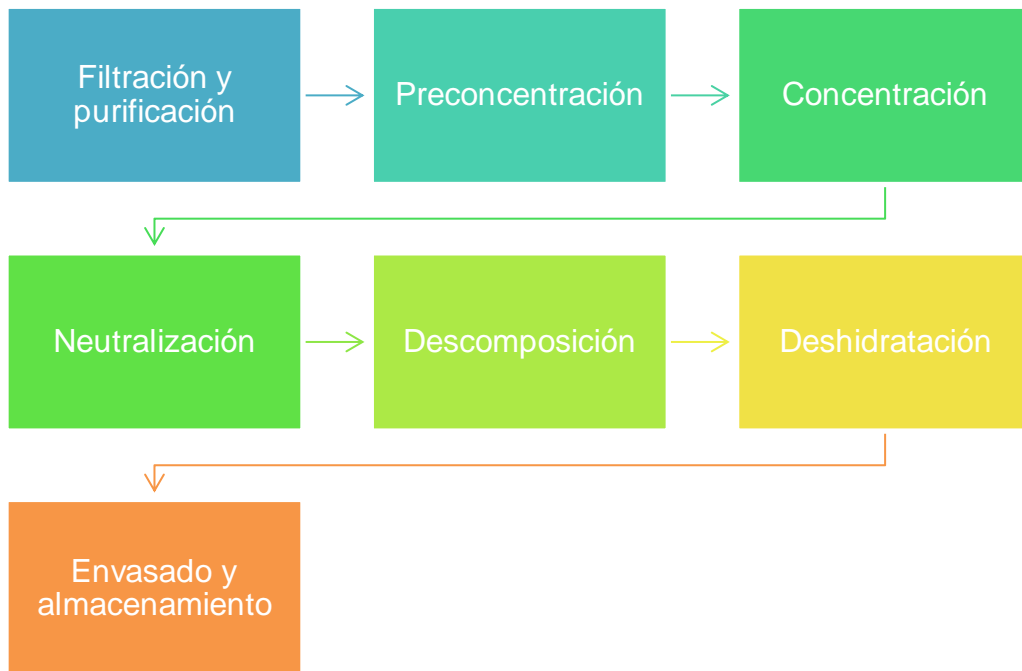


Figura 1. Pasos en el procesamiento de la espirulina

La cianobacteria *A. platensis*, es una cianobacteria filamentososa que pertenece al filo Cyanobacteria (también conocido como algas verdeazuladas o cianofitas). En algún momento en el pasado las especie *Arthrospira platensis* y *Arthrospira máxima* han sido clasificadas en el género *Spirulina*, lo que dio nombre al suplemento alimenticio. Aunque se le suele denominar alga, es importante destacar que las cianobacterias son microorganismos procariotas fotosintéticos, lo que significa que son más similares a las bacterias que a las algas eucariotas. (Figura 2)

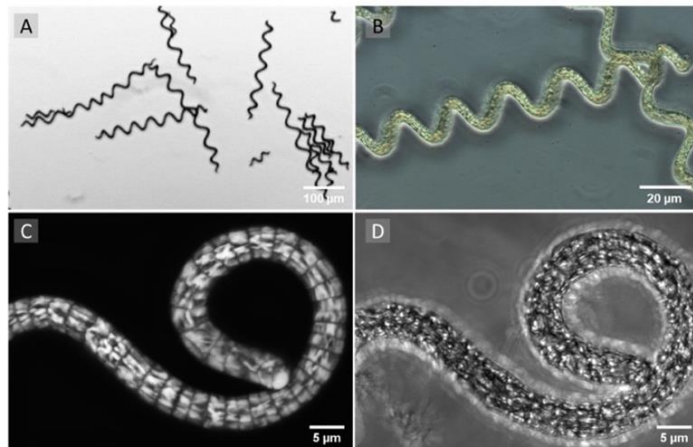


Figura 2. A,B) Imágenes de contraste de fase representativas de *Arthrospira platensis* (AP) sin fijar. (C) Proyección ortogonal de una pila de imágenes tridimensionales de microscopía de barrido láser (47 imágenes individuales) de AP. Microscopía de barrido láser sin etiquetas de una muestra sin fijar. La muestra se emitió a una longitud de onda de 555 nm. Las emisiones se detectaron entre 650 nm y 700 nm. (D) Imagen en modo transmitido de la misma posición. Las imágenes se tomaron a 100 aumentos primarios con un Axio Observer.Z1/7 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania). Tomada de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33513794/>

La espirulina es ampliamente reconocida por su valor nutricional y sus posibles beneficios para la salud. Tiene una forma en espiral característica que le da su nombre y generalmente presenta un color azul-verdoso intenso debido a la presencia de pigmentos fotosintéticos, como la clorofila y la ficocianina

La espirulina ha sido utilizada como suplemento alimentario y en la alimentación humana durante siglos en diversas culturas, especialmente en regiones con lagos y cuerpos de agua donde la cianobacteria crece de forma natural. Se puede consumir en diversas formas, como comprimidos, cápsulas, polvo o incorporada en alimentos y bebidas. (Steffen, 2021) (Fernández-Rojas y col., 2014)

*A. platensis* presenta una composición que consta aproximadamente de un 55-70% de proteínas, un 15-25% de polisacáridos, un 5-6% de lípidos, un 6-13% de ácidos nucleicos y un 2.2-4.8% de minerales. Los lípidos y las proteínas contenidas en la espirulina son especialmente notables. Aproximadamente, un 1.5-2.0% de estos lípidos se componen de ácidos grasos poliinsaturados, destacando el ácido linoleico, junto con ácidos estearidónico, eicosapentanoico (EPA), docosahexaenoico (DHA) y araquidónico (FAO, 2008). Además, en comparación con otras fuentes de proteína, la espirulina contiene una cantidad muy reducida de colesterol, aproximadamente 32.5 mg por cada 100 g. De su contenido de proteínas, la C-ficocianina ha sido objeto de extensos estudios debido a sus efectos, como los anticancerígenos, entre otros.

Además, la espirulina alberga vitaminas B1, B2, B3, B6, B9 y B12, así como una variedad de minerales, que incluyen calcio, cromo, cobre, hierro, manganeso, magnesio, fósforo, selenio, sodio y zinc. (Wan y col., 2016).

### 1.3 Propiedades de la *Arthrospira platensis*

La espirulina también exhibe diversas propiedades beneficiosas para la salud humana y su aplicabilidad en la producción de alimentos:

- **Actividad anticancerígena:** La actividad anticancerígena de la espirulina ha sido objeto de amplia investigación y, en algunos estudios, se ha relacionado con la presencia de compuestos tetrapirrólicos vinculados a la molécula de bilirrubina. Experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado una notable reducción en la presencia de especies reactivas al oxígeno a nivel mitocondrial, así como una modulación en el estado redox del glutatión y una disminución en la proliferación de líneas celulares pancreáticas humanas, la cual es dosis-dependiente con respecto a la espirulina utilizada (KonicKová y col., 2014). Asimismo, en otros estudios, se ha observado una disminución en la proliferación de células humanas de carcinoma de pulmón A549 en respuesta al consumo de espirulina (Czerwonka y col., 2018).
- **Propiedades antimicrobianas:** El extracto acuoso de la espirulina ha demostrado efectos antimicrobianos frente a bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y al hongo *Aspergillus niger*. Este hallazgo abre nuevas posibilidades para investigar el desarrollo de potentes agentes antimicrobianos derivados de *A. platensis*, que podrían aplicarse en la industria alimentaria. (El Sheekh y col., 2014). Además, en otros estudios se ha constatado que los extractos



de espirulina obtenidos con disolventes como metanol y hexano también pueden ejercer un efecto significativo contra patógenos, incluyendo bacterias y hongos, como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *A. flavus*, *A. niger* y *C. albicans*. (Usharani y col., 2015)

- **Protección contra la toxicidad de metales pesados:** Varios estudios han indicado que la suplementación con espirulina puede mitigar los efectos adversos de la intoxicación por metales pesados como el cadmio, mercurio, plomo y arsénico. En la mayoría de estos estudios, se ha observado una disminución en la toxicidad causada por los metales pesados, y en algunos casos, se ha atribuido principalmente al poder antioxidante de la espirulina. (Bhattacharya y col., 2020)
- **Actividad antioxidante:** La capacidad antioxidante de la espirulina ha sido objeto de extensa investigación y se atribuye principalmente a su contenido proteico, en particular a la C-ficocianina. Además, se han identificado varios mecanismos antioxidantes inducidos por la espirulina, que incluyen la activación de enzimas antioxidantes, la inhibición de la peroxidación de lípidos y del daño al ADN, la neutralización de radicales libres, así como un aumento en la actividad de enzimas como superóxido dismutasa y la catalasa. (Wu y col, 2016)
- **Efecto inmunoestimulante:** La Academia China de Ciencias Médicas ha observado que la inclusión de espirulina en la dieta de ratones resulta en un aumento tanto en la tasa de supervivencia como en la duración de la supervivencia después de la exposición a una dosis letal de radiación. Además, se ha observado un incremento en la actividad de la enzima superóxido oxidasa (FAO, Food loss index from post-harvest to distribution., 2016)
- **Suplemento alimenticio:** La incorporación de espirulina como un suplemento alimenticio en la nutrición humana ha demostrado diversos beneficios. En primer lugar, la espirulina presenta un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, incluyendo aproximadamente un 2 por ciento de ácido  $\gamma$ -linolénico. Esto la convierte en una de las pocas fuentes de este ácido graso en la dieta humana, junto con la leche humana y extractos de plantas como rosa mosqueta, moras y borrajo, entre otros. La suplementación de la dieta con ácido linolénico ha mostrado beneficios en enfermedades como la artritis, enfermedades cardíacas y la obesidad (FAO, The State of Food and Agriculture, 2019).

## 1.4 Aplicaciones en alimentos

La espirulina se presenta como una opción versátil para enriquecer una amplia gama de alimentos, aprovechando sus propiedades antioxidantes y su capacidad para elevar el valor nutricional de los productos en los que se incorpora. A continuación, se mencionan algunos ejemplos de alimentos en los que se ha empleado con éxito:

- **Bebidas:** La espirulina se integra en diversas bebidas, ya sean preparados lácteos, téis o bebidas funcionales, en forma de polvo o extracto. En este contexto, se aprovecha para enriquecer el perfil nutricional de la bebida, como, por ejemplo, aumentar el contenido de vitamina C, al incorporar proteína de espirulina. Esto proporciona productos más completos y con propiedades funcionales adicionales.
- **Productos de panadería:** De manera similar a la categoría anterior, es posible incorporar espirulina en la elaboración de pan y productos relacionados, como pasta o galletas, con el objetivo de mejorar su perfil nutricional. Esto se logra al añadir una fuente adicional de proteínas, así como ciertas vitaminas y minerales, al mismo tiempo que se potencian las propiedades antioxidantes y funcionales del producto resultante. Un beneficio adicional es que la inclusión de espirulina en el pan puede estabilizar sus características de retención de agua a lo largo del tiempo, prolongando así su vida útil en el estante. El rango de utilización de la espirulina en este tipo de productos varía entre el 0.1% y el 1.5%, evitando niveles de uso más elevados que podrían afectar negativamente la apariencia y el color del producto final, lo que podría resultar desfavorable para los consumidores (Hosseini y col., 2013).
- **Postres y golosinas:** La inclusión de espirulina en postres y productos dulces se ha investigado como una forma de introducir ingredientes altamente funcionales y nutritivos en una categoría de alimentos ampliamente consumida y muy apreciada. Como se mencionó previamente, al agregar espirulina a estos productos, se incorpora proteína y se infunden propiedades antioxidantes y nutracéuticas en alimentos que, por lo general, no poseen estas cualidades. Además, en algunos tipos de dulces, la espirulina o sus extractos pueden utilizarse como colorantes debido a su distintivo tono verde/azul, que es difícil de replicar con otros colorantes de origen natural. (Hosseini y col., 2013)
- **Productos lácteos:** La incorporación de espirulina en productos lácteos fermentados ha demostrado beneficios al mejorar el rendimiento de los cultivos iniciadores. Esto se traduce en un efecto protector sobre estos cultivos, incrementando su tasa de crecimiento y supervivencia tanto durante el proceso de fermentación como en el almacenamiento a lo largo de la vida útil del producto.

Además, el contenido de ácidos grasos presentes en la espirulina complementa de manera significativa el perfil nutricional de la leche y sus derivados. (Hosseini y col., 2013).

### 1.5 Contenido y perfil de proteínas en *A. platensis*

La espirulina se destaca por poseer uno de los más altos contenidos de proteína entre las fuentes de alimento de origen microbiano, con un rango que oscila entre 460-630 g/kg en masa seca. Este valor la equipara a otras fuentes de proteína como la soja, que tiene alrededor de 400 g/kg en masa seca, y se acerca a la carne, que varía entre 710-760 g/kg en masa seca. Lo que hace que la proteína de espirulina sea particularmente valiosa es su perfil de aminoácidos, que la posiciona como superior a otras fuentes de proteína vegetal gracias a su equilibrio de aminoácidos esenciales, especialmente valina, treonina e isoleucina. (FAO, The State of Food and Agriculture, 2019). De hecho, según los estándares establecidos por la FAO sobre los requerimientos de aminoácidos esenciales, la proteína de espirulina puede considerarse una proteína completa y de alta calidad, comparable a las de origen animal.

Es importante destacar que el nivel de proteína en la biomasa de espirulina puede verse significativamente influenciado por las condiciones de cultivo. Factores como la temperatura, el pH, la exposición a la luz, la disponibilidad de nutrientes y micronutrientes pueden afectar tanto la producción de biomasa como, en ocasiones, la producción de proteína. En algunos estudios, se ha vinculado el aumento en la producción de proteína a la suplementación del medio de cultivo con fuentes de nitrógeno y micronutrientes de origen vegetal, como las vinazas. (Coca y col., 2015). En estos casos, la suplementación adecuada puede conducir a un incremento significativo tanto en la producción de biomasa como en la de proteína en el producto final.

Muchos de los beneficios para la salud atribuidos a la espirulina están relacionados con su contenido proteico, especialmente en lo que concierne a la C-ficocianina. Por lo tanto, la extracción de ficobiliproteínas de la espirulina, incluyendo la C-ficocianina, ha sido objeto de investigación extensiva en los últimos años, para optimizar el proceso de extracción y hacerlo económicamente viable, con el fin de promover su uso como ingrediente en alimentos y otros productos. (Lupatini y col., 2016)

## 1.6 *A. platensis* como fuente de ficocianina

La microalga *A. platensis* es una cianobacteria rica en ficocianina, la cual es una ficobiliproteína que está presente en la especie *A. platensis*. Esta proteína presenta una gran variedad de funciones para la salud como actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, citotoxicidad fotoinducida y estimulante del sistema inmunológico.

La ficocianina tiene una estructura específica formada por el ensamblaje de los monómeros de ficobiliproteínas que son heterodímeros compuestos por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  y sus respectivos cromóforos unidos mediante un enlace tioéter. (Figura 3)

Cada subunidad se compone de ocho hélices  $\alpha$ . Los monómeros se agregan espontáneamente para formar trímeros en forma de anillo ( $\alpha\beta$ ) que tienen simetría rotacional y un canal central. Los trímeros se agregan en pares para poder formar hexámeros ( $\alpha\beta$ ) a veces asistidos con proteínas enlazantes adicionales. Cada barra de ficobilisoma generalmente tiene dos o más hexámeros de ficocianina. A pesar de la similitud general en la estructura y en el ensamblaje de las ficobiliproteínas, existe una gran diversidad en las conformaciones de hexámeros y varillas, incluso cuando solo se consideran las ficocianinas. A mayor escala, las ficocianinas también varían en la estructura cristalina, aunque la relevancia biológica de esto es discutible. (Fernández.Rojas y col., 2014)

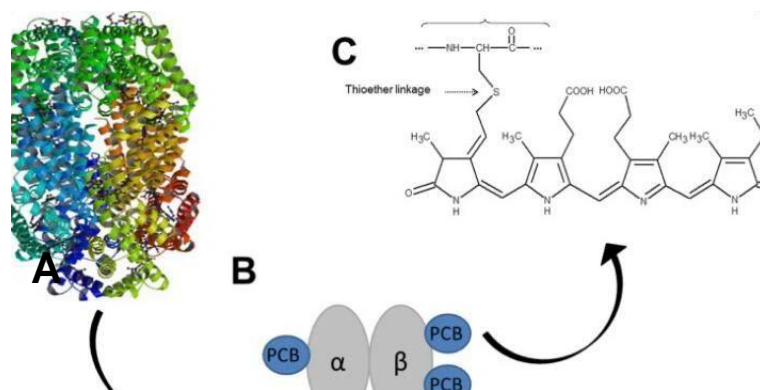


Figura 3. Estructura de la ficocianina (PC). (A) Estructura cristalina de la PC de la cianobacteria *S. platensis* en forma de hexámero, imagen de PDB (<http://www.rcsb.org>) de PDB ID 1GH0 (2011). (B) Representación esquemática del ensamblaje de la PC. Se compone de dos subunidades proteicas, cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , una ficocianobilina (PCB) está unida a la subunidad  $\alpha$  y dos PCB están unidas a la subunidad  $\beta$ . (C) Estructura química de la PCB, el cromógeno responsable del color azul de la PC.

En muchas cianobacterias el cromóforo ficoeritrobilina está enlazado exclusivamente a  $\alpha$ -ficoeritrina y  $\beta$ -ficoeritrina: dos moléculas de ficoeritrobilina están unidas a la subunidad  $\alpha$  y tres están unidas a la subunidad  $\beta$ . En unas cuantas cianobacterias marinas los ficobilisomas contienen dos tipos diferentes de ficoeritrina y algunos sitios de unión de las subunidades de la ficoeritrina pueden estar ocupados por el cromóforo ficourobilina en lugar de la ficoeritrobilina. Además, la  $\alpha$ -ficoeritrina en estos organismos pueden estar ligada a tres cromóforos en lugar de dos. En las algas rojas, tal como en cianobacterias marinas, las subunidades de ficoeritrina pueden contener algunos cromóforos ficoeritrobilina y ficourobilina. Dado que la máxima transmisión de luz en agua marina es cerca de 500 a 498 nm, el remplazo de ficoeritrobilina por ficourobilina en alfa ficoeritrina, el cual causa un cambio a azul en la máxima absorbancia de los ficobilisomas, puede incrementar la eficiencia en la captura de la luz en un ambiente marino.

Como se mencionó antes las ficobiliproteínas poseen la habilidad de absorber la luz en la región visible del espectro gracias a la presencia de enlaces covalentes ligados a las ficobilinas. Contribuyen con el 30 a 50% de la capacidad de captación de luz. La vía de transferencia de la energía de luz atrapada por las ficobiliproteínas a la clorofila alfa posee una eficiencia mayor al 95% y sigue la siguiente secuencia:

Ficoeritrina  $\longrightarrow$  Ficocianina  $\longrightarrow$  Aloficocianina  $\longrightarrow$  Clorofila  $\alpha$

El contenido de ficocianina de la mayoría de las microalgas oscila  $\pm$  10mg/g aunque muchas especies de microalgas tienen menos concentración, debido seguramente al medio de cultivo y condiciones fisicoquímicas.

La cantidad extraída de ficocianina a partir de *A. platensis* disminuye de laboratorio a escala industrial, y de interior a exterior, debido a la variación en la producción de biomasa y a las fluctuaciones ambientales.

En el trabajo, hemos diseñado sistemas de *raceways* (sistemas abiertos de producción) ricos siempre de nutrientes para que las microalgas puedan crecer y reproducirse sin problemas. Los sistemas tienen una gran ventaja, es decir, que se pueden producir grandes cantidades, pero el inconveniente de tener que controlar siempre manualmente los parámetros físicos-químicos del agua, sus nutrientes y sobre todo evitar cualquier tipo de contaminación que puedan perjudicar la calidad de las microalgas.

Otro sistema importante en la producción de las microalgas son los sistemas cerrados, conocidos también como fotobiorreactores, donde los controles físicos-químicos del agua están automatizados, en ellos es imposible cualquier tipo de contaminación cruzada, pero el inconveniente es que la concentración de biomasa de microalgas que se producen es menor, pero de alta calidad. (Fogg y col., 1987)

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La creciente demanda en la actualidad de alimentos y bebidas saludables con incorporación de beneficiosos compuestos naturales, como pudiera ser la ficocianina, así como, el creciente interés del mercado en las bebidas isotónicas hizo posible, después de una amplia revisión bibliográfica para ver el estado del arte del tema, seleccionar un proyecto de investigación para estudiar una viable bebida isotónica con ficocianina.

Por tanto, el proyecto de investigación tiene como objetivo general el desarrollo de una bebida isotónica utilizando las microalgas y en particular la ficocianina, extracto de *Arthrospira platensis*. La primera fase del proyecto consiste en el estudio de la extracción de la ficocianina. Seguidamente, se estudia la estabilidad de la ficocianina en bebidas, su capacidad antioxidante y antirradicales libres. Finalmente, se caracterizan las microalgas y los extractos de ficocianina obtenidos. El proyecto permitirá conocer las características de las microalgas y de sus extractos. En esta fase se emplearán técnicas de investigación cualitativa para poder identificar aquellas características que han de tener los prototipo para el desarrollo de una bebida isotónica. Los resultados de los estudios se emplean en otras fases del proyecto en coordinación con la empresa Cianoalgae que se desarrolla en el centro de investigación del Basque Culinary Center.

El Plan de trabajo resumido que muestra objetivos generales y específicos queda recogido seguidamente:

- Obtención de ficocianina a partir de la especie *A. platensis*
  - Extracción de ficocianina de *A. platensis*.
  - Evaluación de la capacidad antioxidante de la ficocianina *in vitro*.
- Análisis del contenido en lípidos, carotenoides y clorofila de *A. platensis* y comparación con otras especies de microalgas.
  - Análisis del contenido en lípidos de *A. platensis*, *C. vulgaris* y *H. pluvialis* mediante HPLC/MS y GC-MS/MS.
  - Determinación de carotenoides y de clorofila de las especies *A. platensis* y *C. vulgaris*.
- Formulación de geles y bebidas isotónicas para deportistas que contienen ficocianina.
  - Formulación de geles y bebidas isotónicas.
  - Análisis de las propiedades organolépticas y de estabilidad.
  - Estudio de aceptabilidad de los geles y bebidas.

### 3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

#### 3.1 Extracción por método tradicional Folch

Las técnicas tradicionales de extracción de compuestos lipídicos como el método de referencia Folch (Folch y col., 1957) o el tradicional Soxhlet, utilizan grandes volúmenes de disolventes orgánicos desaconsejables para la salud y el medio ambiente, empleando, además, largos tiempos en cada extracción con recuperaciones lipídicas relativamente bajas. Por ello, son necesarias nuevas técnicas de extracción con disolventes alternativos para desarrollar nuevos procesos dentro del marco de la química verde. Recientemente se han publicado varias guías de disolventes clásicos y no tan clásicos, evaluándolos en función de su impacto sobre la salud, seguridad y medio ambiente para clasificarlos en: recomendados, problemáticos y peligrosos. Entre los disolventes clasificados como peligrosos aparecen el cloroformo y el hexano, ambos disolventes usados en las extracciones tradicionales como el método Folch.

#### 3.2 Disolventes considerados de base verde para la extracción de carotenoides.

Existe un creciente interés en el desarrollo de nuevos disolventes como alternativa a los derivados del petróleo, con el propósito de evitar el uso de sustancias contaminantes y fomentar una producción más sostenible. Esta producción sostenible se basa en el aprovechamiento de biomasa de origen agroindustrial para generar disolventes bioderivados, los cuales también son biodegradables, promoviendo así la economía circular.

El término "disolvente verde" no tiene una definición clara y universalmente aceptada. Por un lado, se busca reemplazar disolventes más tóxicos y contaminantes, como los clorados (cloroformo o diclorometano), por otros menos dañinos, como la acetona o el etanol. Por otro lado, aunque los disolventes más beneficiosos, como el etanol o el acetato de etilo, en ocasiones pueden ser de origen biológico, generalmente se derivan del petróleo. Lo mismo sucede con el CO<sub>2</sub> utilizado en la extracción supercrítica, que podría provenir de fermentación alcohólica u otros orígenes biológicos, pero que comúnmente se obtiene a través de procesos de la industria química.

En los últimos años, se ha avanzado en el desarrollo y producción industrial de disolventes derivados de biomasa agrícola, como el 2-metil-tetrahidrofurano (2-MeTHF), que puede obtenerse a partir de biomasa de maíz o caña de azúcar. Este compuesto representa una alternativa a los disolventes apolares, como el hexano, y se utiliza en la extracción de



compuestos lipídicos, como los carotenoides. Otros disolventes innovadores que están siendo estudiados incluyen terpenos, limoneno, ésteres de lactato, ésteres de ácidos grasos, lactonas, glicerol, entre otros. Una recopilación de información sobre estos disolventes verdes es la proporcionada por A. Wypych en 2014. Cabe mencionar que, en el caso de aplicaciones en alimentos, es esencial asegurarse de que su uso esté autorizado, aunque en investigaciones se empleen disolventes que aún no hayan sido aprobados por las autoridades, siendo comúnmente referidos como "GRAS" (generalmente reconocidos como seguros) en Estados Unidos.

### 3.3 Lisis celular y PLE para extracciones

El método de lisis celular para extraer ficocianina implica romper las membranas celulares de las microalgas para liberar los componentes deseados, como la ficocianina. Hay varias formas de realizar la lisis celular, y una de las técnicas utilizadas comúnmente implica el uso de osmosis.

En este método, se someten las microalgas a un cambio osmótico mediante la introducción de un agente osmótico, como una solución hipotónica o hipertónica, que causa la ruptura de las células al alterar el equilibrio osmótico y generar presión sobre las membranas celulares. Esto libera los componentes intracelulares, incluida la ficocianina, que luego se pueden extraer y purificar para su uso.

Es importante destacar que existen otras técnicas de lisis celular, como el uso de ultrasonidos, tratamientos químicos o físicos, cada uno con sus propias ventajas y desventajas en términos de eficiencia y costes.

A diferencia de la lisis celular el PLE (Presurized Liquid Extraction) es una técnica de extracción que utiliza disolventes líquidos a alta presión y temperatura para extraer compuestos de interés de muestras sólidas. En el caso de la extracción de ficocianina de microalgas, el PLE se podría utilizar de la siguiente manera:

- **Preparación de la muestra:** Las microalgas se secan y trituran para aumentar la eficiencia de extracción.
- **Carga de la celda de extracción:** La muestra se coloca en una celda de extracción diseñada para resistir altas presiones. Esta celda se llena con el disolvente adecuado.
- **Aplicación de presión y temperatura:** La celda se sella y se somete a condiciones de alta presión y temperatura. El disolvente líquido, a presión elevada y temperatura controlada, se bombea a través de la muestra. La combinación de presión y

temperatura ayuda a solubilizar y extraer la ficocianina y otros compuestos deseados de las células de microalgas.

- **Recuperación de la extracción:** La disolución resultante, que contiene la ficocianina disuelta, se recoge y se separa del residuo de la muestra.
- **Purificación y análisis:** Se puede purificar la ficocianina de la disolución obtenida y realizar análisis adicionales para asegurar la calidad y pureza del extracto.

El PLE se considera una técnica eficiente y relativamente rápida para la extracción de compuestos de muestras biológicas, ya que reduce el tiempo de extracción y el uso de disolventes en comparación con otros métodos convencionales. Además, al controlar la presión y temperatura, se puede optimizar para obtener rendimientos y purezas deseables en el extracto de ficocianina.

## 4. EXPERIMENTAL

### 4.1 Equipos

A continuación, se detallan los equipos que se han utilizado para la investigación. En las muestras desarrolladas se analizó: 1) la composición de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) empleando Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento asociada a un Detector de Pulso Amperométrico (HPLC-PAD) (HPLC: Knauer Azura ® y PAD: Merthom AG); 2) el pH de las muestras mediante el pHmetro Krison Basic 20 (Crison Instruments SA) 3) el color a través del colorímetro reportando las coordenadas CIELAB (Konica Minolta), 4) la acidez total a través de volumetría identificativa por cambio de pH, y 5) los sólidos solubles totales a través del refractómetro de mano (Digital Handheld Refractometer VWR).

Se empleó también un cromatógrafo gases masas (GC-MS) Agilent Technologies (Palo Alto, Cal, USA) serie 5975 MSD con inyector automático y helio como gas portador. La columna capilar empleada fue HP-88 de Agilent Technologies de dimensiones 100 m x 0,25 mm x 0,20  $\mu$ m, con una temperatura de inyección de 250°C. El horno se mantuvo a 175°C durante 10 min, luego se elevó a temperatura con una ratio de 3°C/min hasta los 220°C y se mantuvo durante 20 minutos adicionales. La temperatura del detector fue de 230°C. La cantidad de muestra inyectada fue de 1  $\mu$ L con split 1:10. En el espectrofotómetro de masas se utilizó un potencial de ionización de 70 eV y un rango de masas atómicas de entre 30 y 400 amu (unidades de masa atómica).

### 4.2 Materiales y otros aparatos

- Micropipetas (Gilson, Los Angeles, CA) de volúmenes 5-50  $\mu$ L, 10-100  $\mu$ L y 100-1000  $\mu$ L.
- Material desechable: puntas de micropipetas, Eppendorf, pipetas Pasteur, tubos Falcon. (ThermoFisher, Los Angeles, CA)
- Homogeneizador Ultraturax
- Espectrofotómetro DU450 (Becman-Coulter, Tennessee, USA)

### 4.3 Reactivos

Los reactivos y disolventes y su procedencia se detallan a continuación: el hidróxido de potasio fue suministrado por Scharlau (España); el sulfato de sodio 1-hidrato y el citrato de sodio por Panreac (España); la luteína 5% por Hunan nutramax INC (China) y la fucoxantina y el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (China); los disolventes cloroformo, metanol, etanol absoluto, metil tert-butil éter (MTBE), isooctano (2,2,4 trimetilpentano), el acetato de etilo y el 2-propanol fueron suministrados por Macron Fine Chemicals (Estados Unidos). El 2-metiltetrahidrofurano (2-metil-THF) por Penachem (Estados Unidos); y el agua utilizada fue de grado Milli-Q (Millipore Sigma, Estados Unidos). Todos los disolventes usados fueron grado analítico o grado HPLC. La trehalosa, disacárido, fue utilizado como soporte para obtener el polvo.

### 4.4 Microalgas y componentes utilizados

La microalga *A. platensis* fue obtenida de la empresa Cianoalgae SL (España). A partir de los resultados del cultivo de microalgas y teniendo en cuenta que el cultivo con *A. platensis* fue uno de los que mejores resultados proporcionó, se identificaron los procesos más adecuados para la extracción, purificación y estabilización de ficocianina.

La ficocianina es uno de los principales pigmentos colorantes de la microalga *A. platensis*. Se trata de una proteína de la familia de las ficobiliproteínas que se caracteriza por su color azul intenso y su estructura está formada por un componente proteico y uno no proteico conocido como ficocianobilina (Patel, 2005). El color de este producto hace que pueda usarse como colorante natural (la máxima absorción del pigmento es a una longitud de onda máxima,  $\lambda_{max}$ , entre 616 y 620nm).

La ficocianina tiene una baja estabilidad a la luz, oxígeno, metales, agentes oxidantes, temperatura y al pH. (Marín Prida y col., 2015).

Debido a la importancia del color en la percepción y la aceptación de los productos alimentarios por parte del consumidor, se trabajó en estabilizar el color azul característico de la ficocianina, con la colaboración, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, para obtener bebidas y geles deportivos con un color azul de forma constante y duradero en el tiempo. Así mismo, se evaluaron diferentes alternativas para la estabilización del color de la ficocianina con el objetivo de encontrar una metodología, que, además de estabilizar el color, fuera sostenible y rentable para el proceso de producción industrial futuro de las bebidas y geles deportivos.

Es importante mencionar, que inicialmente para realizar una disolución con ficocianina hay que mantener un pH entre 5 y 7. Por debajo de 5 precipita y por encima de 7 puede desnaturalizarse y volverse amarillo. Por otro lado, temperaturas superiores a 40°C pueden alterar el color azul del producto.

#### 4.5 Procedimientos en el cultivo de microalgas

**Crecimiento de las microalgas.** Diseñamos sistemas de *raceways* (sistema abierto de producción) ricos siempre de nutrientes para que las microalgas puedan crecer y reproducirse sin problemas. Estos sistemas tienen la gran ventaja de poder producir grandes cantidades, pero el inconveniente es que hay que controlar siempre manualmente los parámetros físico-químico del agua, sus nutrientes y sobre todo evitar cualquier tipo de contaminación que puedan perjudicar la calidad de las microalgas.

Los sistemas cerrados, también llamados fotobiorreactores (PBR), son fundamentales en la producción de microalgas. En estos sistemas, los controles físico-químicos del agua están automatizados, evitando cualquier contaminación cruzada. Sin embargo, un inconveniente es que la concentración de biomasa de microalgas producida suele ser menor, aunque de alta calidad. (Fogg y col., 1987)

Se cultivaron tres especies de microalgas *C. vulgaris*, *H. pluvialis*, y la cianobacteria *A. platensis*, teniendo en cuenta las características sensoriales de las microalgas esperadas para el posterior desarrollo de nuevas bebidas/geles. Esta actividad se ha podido desarrollar gracias a la colaboración de la empresa Algaloop S.L. (Astesu, Guipúzcoa, España).

Para evaluar la efectividad de la instalación en el crecimiento de las diferentes microalgas se realizó una investigación descriptiva. En ella se describió la tasa de crecimiento y la productividad de cada una de las microalgas, además de sus características bioquímicas al ser expuestas a condiciones climatológicas favorables. Tras la recolección, se midió la turbidez a 600nm con un espectrofotómetro y el peso seco de las biomásas obtenidas. Los resultados se encuentran en el apartado Resultados y discusión, en las Figuras 17 a 19.

Respecto al modo de operación de los fotobiorreactores para el cultivo de microalgas, en primer lugar, se comenzó con cultivos en modo discontinuo para estudiar el crecimiento de las microalgas: concentración de biomasa alcanzada al final de la fase de crecimiento exponencial, productividad de biomasa y velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). Seguidamente, se procedió al cultivo en modo semicontinuo para simular las condiciones de operación reales en una planta a mayor escala.

En cuanto al medio de cultivo, se utilizaron para el crecimiento de las microalgas el medio laboratorio (medio Jordan) y en su escalado en fotobiorreactores (medio Zarrouk).

El medio Jordan es una disolución nutritiva utilizada para el cultivo de microalgas, especialmente en investigaciones y aplicaciones industriales. Fue desarrollado por el científico Chantal Jordan y se utiliza para proporcionar a las microalgas los nutrientes esenciales que necesitan para crecer de manera saludable. Este medio es particularmente conocido por su capacidad para mantener el crecimiento de microalgas en condiciones controladas de laboratorio.

El medio Zarrouk, al igual que el medio Jordán, es empleado como un medio de cultivo para facilitar el desarrollo de microalgas. Su composición básica proporciona los nutrientes esenciales necesarios para el crecimiento saludable de estos microorganismos. El nitrato de sodio y el fosfato ácido de potasio son las fuentes de nitrógeno de fosfato que lo componen. La simplicidad del medio Zarrouk y su capacidad para estimular el crecimiento de diversas especies de microalgas lo han destacado en la investigación científica. Se utiliza en estudios que buscan comprender el comportamiento de diferentes especies de microalgas, permitiendo a los investigadores optimizar las condiciones de cultivo. Como es común con otros medios de cultivo de microalgas, los investigadores tienen la flexibilidad de ajustar la composición del medio Zarrouk para adaptarse a las necesidades específicas de la microalga en cultivo y los objetivos particulares de su investigación.

Una vez aisladas las microalgas de interés, éstas fueron cultivadas inicialmente en matraces de 250 mL, 500 mL y 2000 mL usando aireadores para inocular aire con agitación orbital a 200 rpm con una intensidad de luz de 100 lux a 28°C (Figura 4).



Figura 4. Escalado de *A. platensis* en matraz tipo Erlenmeyer desde 250 mL a 2000 mL. Tomada por Algaloop SL

Después se transfirieron a botellones de vidrio con tapa rosca hasta observar coloración verdosa. Posteriormente se procedió al escalado a volúmenes mayores de fotobiorreactores de 100 L, hasta llegar finalmente en un PB tipo *raceway* de 2000 L (Figura 5).



Figura 5. Fotobiorreactores de 100 L en los que se ha escalado de cultivo y adaptado a condiciones de luminosidad y temperatura para las tres especies de microalgas. tomada por Algaloop SL

El cultivo de microalgas se cosechó por centrifugación. Para ello, se distribuyó 200 mL del cultivo en cuatro tubos para centrífuga de 50 mL y se procedió a centrifugar a 500 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante e inmediatamente se añadió más cultivo en los mismos tubos y se continuó con la centrifugación en las condiciones indicadas. Estos

pasos se repitieron hasta obtener toda la biomasa de microalgas de 5 L de cultivo. Seguidamente, el precipitado de microalgas de los 4 tubos fue transferidos a un solo tubo, el que se centrifugó a 4500 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado de microalga se resuspendió con 30 mL de suero fisiológico. (Santillan, 1974)

Sistemas de control. La evaporación de agua se compensaba cada día antes de proceder a la toma de muestra, y siempre a la misma hora. Una vez tomada la muestra, se procedía a realizar los siguientes análisis como sistemas de control y de crecimiento de microalgas:

- Concentración de biomasa. Para determinar el crecimiento de los cultivos en los diferentes fotobiorreactores se midió diariamente la absorbancia a 750 nm mediante un espectrofotómetro, pudiendo determinar la concentración de biomasa mediante cuatro curvas de calibrado. No obstante, la estimación de concentración de biomasa por espectrofotometría se validó mediante la determinación del peso seco, para lo que se filtraron 40 ml de cultivo en un filtro con un diámetro de poro de 1µm previamente pesado. Estos filtros se secaron durante 24h en una estufa a 80°C y posteriormente, se pesaron nuevamente, permitiendo así obtener el peso seco de biomasa en g/L.
- Observación morfológica. Al comienzo y al final de cada ensayo se realizó un estudio del estado del cultivo y la morfología celular por microscopía óptica a diferentes aumentos (x 10 y x 40), con el microscopio. De esta manera, se comprobó que se trataba de un cultivo monoalgal libre de especies no deseadas (Figura 6).

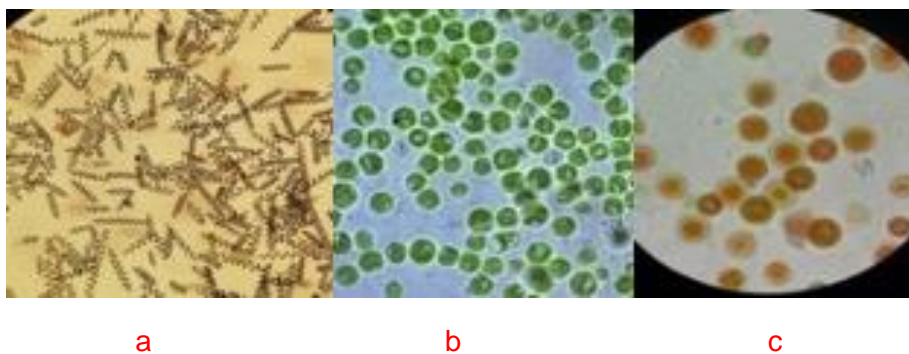


Figura 6. Imagen al microscopio de a) *A. platensis* donde se aprecia la última estructura de los tricomas de las células, b) *C. sp.* y c) *H. pluvialis* donde se visualiza la acumulación de astaxantina color rojo en las células. (tomada por AlgaeBase, National University of Ireland, Galway)



## 4.6 Obtención del extracto de ficocianina

La extracción de ficocianina se obtuvo usando la lisis celular por osmosis debido a su mayor eficacia y a que el coste de otras técnicas de extracción es elevado. Además, este procedimiento es más adecuado para poder escalar industrialmente el producto, ya que otras opciones son muy caras.

A continuación, se centrifugó, se filtró y se concentró por ultrafiltración tangencial.

Se precipitaron las proteínas con sulfato amónico y por último se purificó la ficocianina por cromatografía de adsorción con fase estacionaria de sílice (GreenSea, Francia).

Tras las extracciones se pesaron los extractos y se calculó el rendimiento de estos usando la siguiente fórmula (Ecuación 1):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{peso extracto}}{\text{peso muestra}} \cdot 100 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

El rendimiento de la muestra de espirulina es del 8%, valor medio de 3 réplicas.

### 4.6.1 Método de Folch

La extracción Folch se realizó siguiendo el método original (Folch y col., 1956). A 1 g de microalga se le agregaron 20 mL de metanol:cloroformo (1:2 v:v), se agitó en vórtex vigorosamente y la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm. Posteriormente se recolectó la fase orgánica en un frasco que contenía previamente agua destilada con NaCl a saturación, se agitó en vórtex y se volvió a centrifugar. El proceso de lavado se repitió dos veces, para un total de tres lavados. Finalmente, la fase con cloroformo que contenía los lípidos se secó en una corriente de nitrógeno hasta peso constante. El contenido en lípidos se determinó gravimétricamente y se calculó el rendimiento de extracción como porcentaje en peso de biomasa seca. Los extractos de lípidos obtenidos se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su análisis. El resultado está representado por la gráfica que está en el apartado de Resultados y discusión, en la Figura 23.

## 4.7 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos

El método DPPH se empleó para determinar la actividad antioxidante de los diferentes extractos obtenidos. Este método consiste en medir la capacidad del antioxidante para estabilizar mediante reducción los radicales libres que se liberan por el compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Para determinar la actividad antioxidante se realizaron ensayos de DPPH espectrofotométricos siguiendo el método de Xia (Xia, 2013) con algunas modificaciones. En este caso, 1 mL de las distintas diluciones de los extractos se añadieron a 1 mL de una disolución de DPPH preparado al 0,004% en metanol (A1). De manera adicional, se midió también un blanco con 1 mL de la disolución del extracto y 1 mL metanol (A2), y un control que fue 1 mL de agua destilada y 1 mL de la disolución de DPPH (A0). Las muestras se dejaron reposar en oscuridad durante 30 min y se midió su absorbancia a 517nm. Para la determinación de la inhibición del DPPH se empleó la siguiente fórmula (**Ecuación 2**):

$$\text{Inhibición (\%)} = \left[ 1 - \left( \frac{A1-A2}{A0} \right) \right] \cdot 100 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

El resultado está representado por la gráfica que está en el apartado de Resultados y discusión, en la Figura 14.

### 4.7.1 Determinación del contenido total de carotenoides

Se utilizó un método espectrofotométrico para determinar la concentración de carotenoides totales (CTC). Los extractos obtenidos durante la optimización se disolvieron en metanol a una concentración de 0,05 mg/mL. La absorbancia de estas disoluciones se registró a una longitud de onda de 470 nm. Se utilizó una curva de calibración estándar externa de luteína (0,25–2 mg/mL) para calcular el contenido total de carotenoides en las muestras (Gallego y col., 2019), que se analizaron en todos los casos al menos por duplicado. Los resultados se representaron como mg de carotenoides por gramo de extracto. Los resultados están representados en la gráfica del apartado de Resultados y discusión, en la Figura 13.

#### 4.8 Análisis por HPLC-ELSD del contenido de lípidos polares de los extractos

El perfil de lípidos polares de los extractos se analizó en un equipo de HPLC1260 Infinity acoplado a un detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD) 385 (Agilent Technologies (Palo Alto, California, Estados Unidos) (ELSD) Agilent Technologies 385. El análisis se realizó con una columna ACE de fase normal de sílice (250 mm × 4,6 mm diámetro interno. 0,5 µm) mantenida a 30°C usando un gradiente ternario donde el disolvente A corresponde a isooctano, el disolvente B a MTBE (Metil-terc-butil éter) y el disolvente C a isopropanol como se representa en la Tabla 1. El flujo se mantuvo constante en 1,8 mL/min y a una presión máxima de 600 bar. El gas portador fue nitrógeno. Los tiempos de retención de los lípidos estudiados fueron, de más apolar a más polar: triacilglicéridos: (TAG), 3min, diacilglicéridos (DAG), 5 min; ácidos grasos libres (AGL), 12 min; glucolípidos (GL),18 min y fosfolípidos como fosfatidilcolina (PC), 25min y lisofosfatidilcolina (LPC), 30 min.

## 5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Cinética de crecimiento de las microalgas *A. platensis*, *C. vulgaris* y *H. pluvialis*.

Las curvas de crecimiento de las tres especies de microalgas en discontinuo se muestran en la Figura 7.

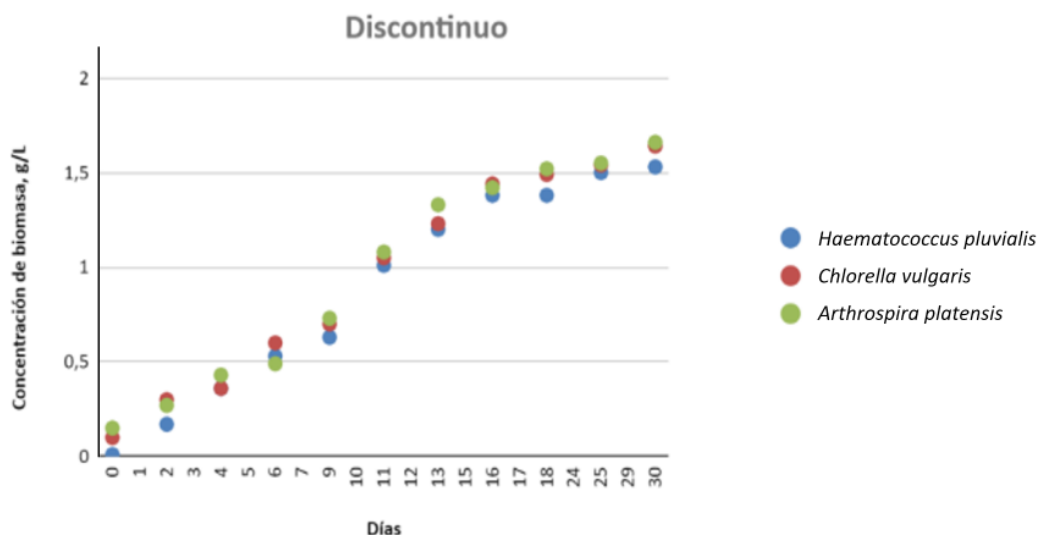


Figura 7. Evolución de la concentración de biomasa con el tiempo en el cultivo discontinuo

La especie de microalga con la tasa de concentración de biomasa más elevada fue *A. platensis* (espirulina) con un 1.68 g/L, una cifra significativamente superior al ligero aumento observado en *H. pluvialis* (1.52 g/L).

Es representativo y de destacar que las microalgas sigan una tendencia similar de crecimiento, lo que indica que todas se han adaptado positivamente a los distintos medios, y a los dos sistemas de cultivo que se han utilizado (fotobiorreactor y biorreactor). Estos datos han sido proporcionales en las medidas de concentración de la biomasa y en medidas de productividad.

Respecto a la productividad de biomasa (Figura 8), *H. pluvialis* presentó la menor productividad, 0.42 g/L(día). Los bajos valores alcanzados al final del ensayo en el cultivo de *H. pluvialis*, con respecto a los valores de espirulina y en menor medida de *C. vulgaris*, están relacionados con el mayor agotamiento de nutrientes en el caso de *H. pluvialis* por el hecho de que se ha sometido a estrés para conseguir la síntesis de astaxantina, el biocompuesto de interés comercial para su uso en alimentación y en cosmética.

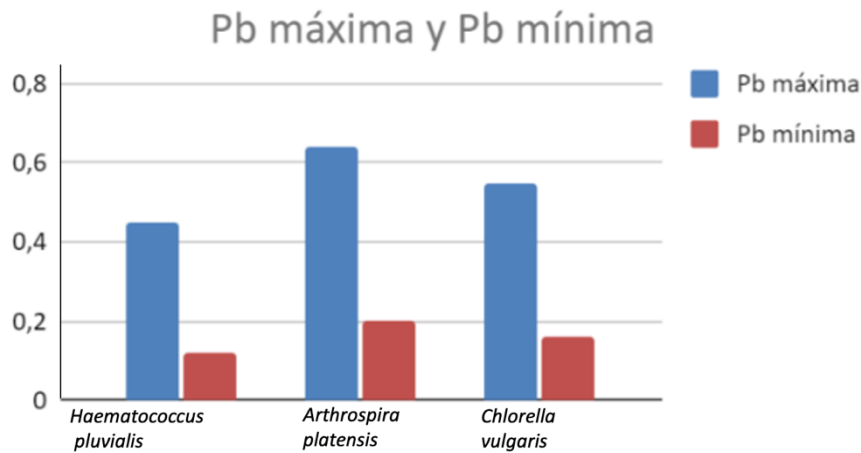


Figura 8. Productividad de biomasa (Pb) máxima y mínima alcanzada para los distintos medios de cultivo ensayados: laboratorio (Jordan) y escalado (Zarrouk)

Para las pruebas del **cultivo de microalgas en sistemas semicontinuos**, en primer lugar, se crecieron las microalgas hasta la fase estacionaria, y se iniciaron los ensayos en semicontinuo con una velocidad de dilución de 0.3 L/día. La fase estacionaria se alcanzó tras las tres primeras semanas de cultivo (Figura 9). Al igual que con los sistemas en discontinuo *A. platensis* alcanzó una mayor concentración en comparación con el resto de las muestras. (1.46 g/L).

### Cultivo microalgas en semicontinuo

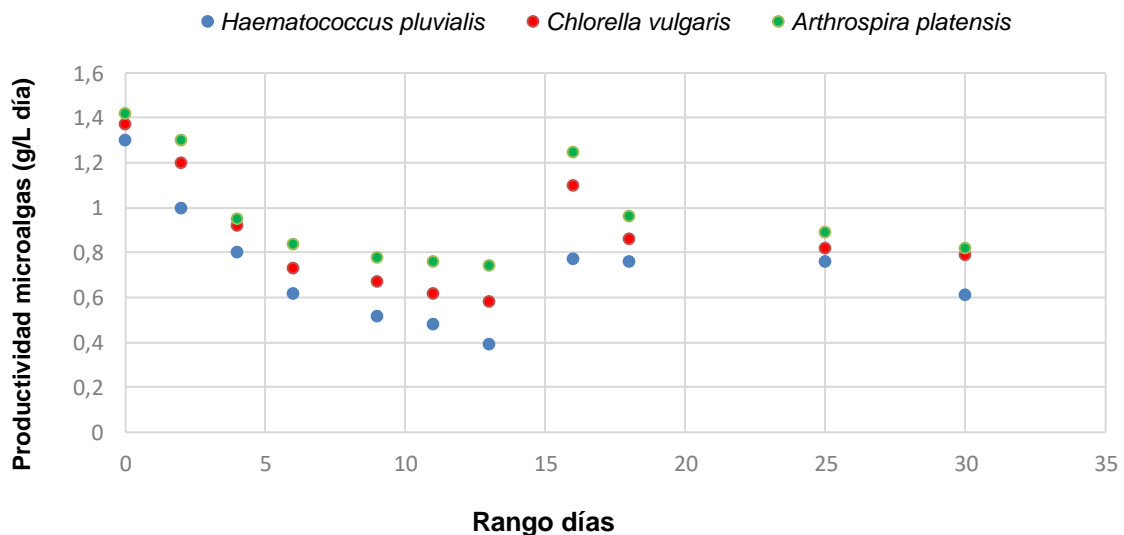


Figura 9. Evolución de la concentración de biomasa con el tiempo en el cultivo semicontinuo

En la productividad de la biomasa, también la *A.platensis* fue la microalga con mayor rendimiento (0.63 g/(L/día)) mientras que el *H. pluvialis* fue el alga con menor rendimiento productividad de biomasa (0.4 g/L/día)) (Figura 10).

En ambos tipos de cultivo se ha llegado a la conclusión de que se puede obtener un cultivo estable con una productividad de biomasa superior a 0.22 g/L(día), con cualquiera de las tres cepas de microalgas.

Por otro lado, la *A. platensis*, también conocida como espirulina, alcanza mejores resultados debido a su mayor capacidad de adaptación a distintos medios y a sistemas de cultivos.

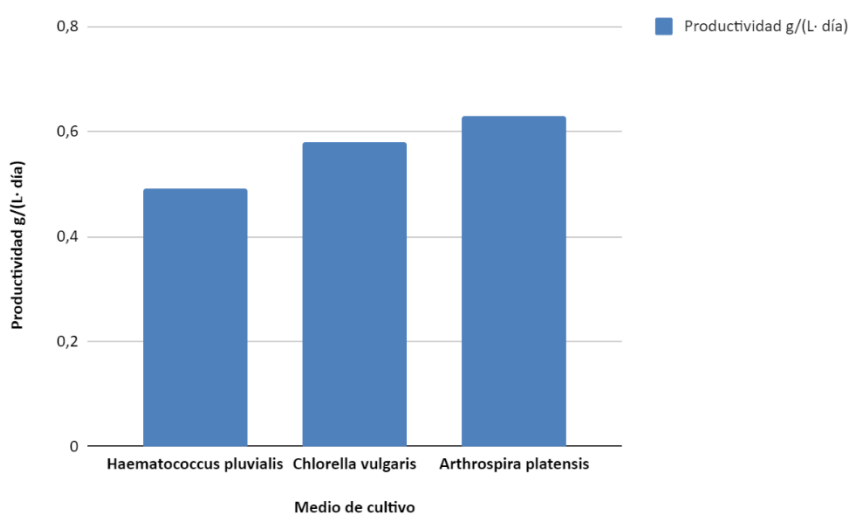


Figura 10. Velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu$  máxima) para las distintas microalgas cultivadas en semicontinuo

*A. platensis* demostró un alto nivel de crecimiento siendo una especie idónea para el escalado industrial. Es capaz además de asimilar eficientemente nitrógeno y fósforo a la vez que tolera altos niveles de CO<sub>2</sub> y otras condiciones ambientales adversas.

Se mejoró el rendimiento de la producción de astaxantina en *H. pluvialis* mediante la disminución de la cantidad de nitrógeno en el medio. Otra estrategia confirmada para el aumento de producción de astaxantina fue el aumento de la exposición a la luz, tanto artificial como solar. Sin embargo, este proceso metabólico de generación de carotenoides como efecto protector frente al estrés lumínico es reversible cuando las condiciones cambian en el medio (adición de sustrato o disminución de la exposición a la luz).

Como problemas detectados, es de especial interés mencionar la efectividad de introducir puntos de observación morfológica para detectar colonias extrañas de microalgas en los biorreactores. En concreto se detectó la presencia de una cianobacteria local tanto en los

matraces, como en el fotobiorreactor y el biorreactor tipo *raceway*. Así mismo se identificaron una serie de mejoras para evitar la contaminación de los biorreactores. Entre ellas mencionar la necesidad de avanzar en las instalaciones para mantener los problemas de seguridad completamente resueltos, y la introducción de más equipos de control de cultivos.

## 5.2 La ficocianina obtenida de *A. platensis* reduce el DPPH

Se purificó con éxito la ficocianina. Para su extracción se utilizaron 5g de *A.platensis*, se extrajo la ficocianina mediante el UT(Ultraturrax) a pH7 y luego se estudió su absorbancia. La absorbancia se calcula según la fórmula que se describe a continuación:

$$[C - FC] = \frac{(A_{615} - (0.474 * A_{652}))}{5.34}$$

Donde, 615 y 652 nm son el rango de absorbancia de la ficocianina, mientras que 0.474 y 5.35 son números empíricos que nos permiten conocer el índice de pureza de la ficocianina.

Utilizando la ficocianina a pH7 se obtiene un resultado de 7.75mg/mL

Tabla 1. Datos de absorbancia a pH7 de la *A.platensis*

Datos	A615	A280	A520	Ratio 615/280	Resultado mg/mL
UT pH7 (2)	0.807	0.38	0.352	2.12	7.75mg/mL

También se ha estudiado la capacidad antioxidante de la ficocianina a través del método DPPH. (Figura 11)

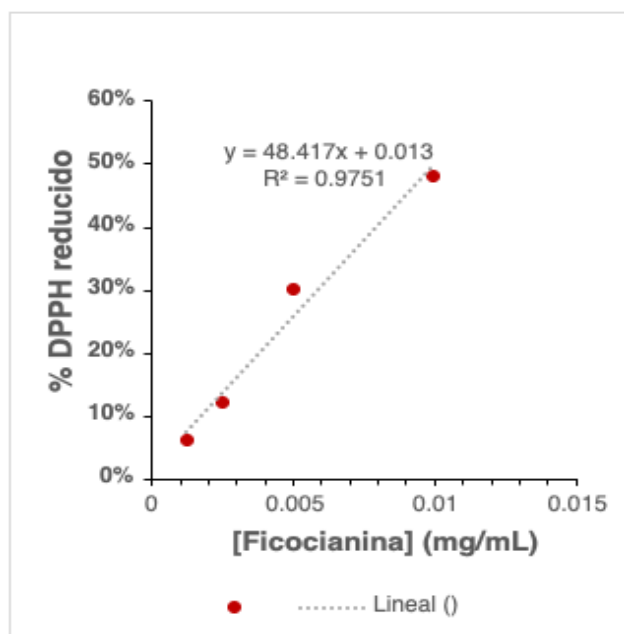


Figura 11. Análisis mediante el método DPPH de la muestra de ficocianina

En este caso vemos que aumentando la concentración de ficocianina aumenta su poder antioxidante, es decir el DPPH se reduce más.

### 5.3 Análisis bioquímico de las microalgas

Se realizó el análisis de algunos biocompuestos de *H. pluvialis* y *C. vulgaris*, *A. platensis*, para ello se llevaron a cabo extracciones mediante el método Folch o por líquidos a presión (PLE), y el análisis se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Para *H. pluvialis* se estudió el contenido en lípidos, así como el perfil de ácidos grasos de esta alga. En este caso se aplicó el método Folch, que es útil y eficaz para realizar la extracción de lípidos en frío, lo que ayuda a mantener todo el contenido de lípidos sin alterar su cantidad o calidad, como se haría con la técnica convencional en caliente de Soxhlet. Este método indicó que el alga *H. pluvialis* tenía un extracto medio de 0.2902g de lípidos, con un rendimiento total de  $28.31\% \pm 0.71$ . El estudio de PLE indicó que el contenido medio de carotenoides totales era de  $2.98 \pm 0.57$  mg/ml. En último lugar, GC-MS permitió separar, identificar y cuantificar los ácidos grasos presentes en la biomasa. En resumen, la microalga liofilizada fue extraída mediante el método tradicional Folch para analizar su contenido en ácidos grasos y carotenoides, los compuestos bioactivos de interés del presente trabajo, mediante GC-MS y HPLC-ELSD/DAD.



Como se puede ver la muestra de *A.platensis* tiene un rendimiento del 8% y una desviación estándar de 0.21. El rendimiento de *H. pluvialis* obtenido es mayor rendimiento en lípidos respecto tanto a la *C. vulgaris* como a la *A. platensis*. (Figura 12)

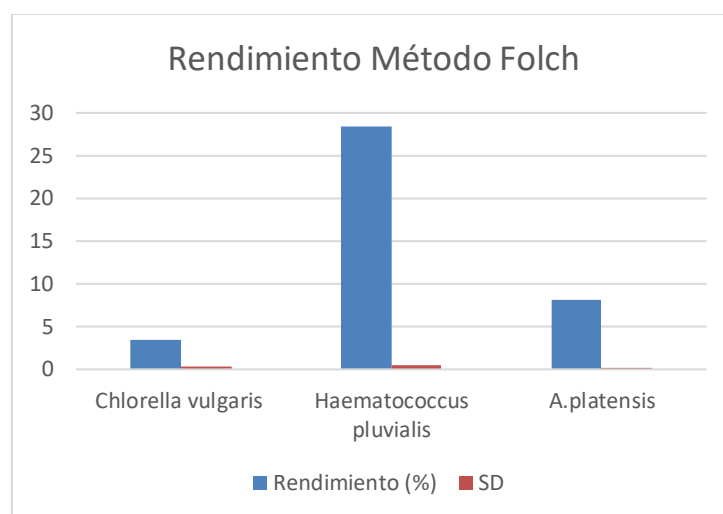


Figura 12. Rendimiento de la *A.platensis*, *C. vulgaris*, *H. pluvialis*

La Tabla 2 muestra los resultados cromatográficos obtenidos, dónde se identifica que el ácido graso mayoritario presente en *H. pluvialis* era el ácido palmítico (16:0) seguido del ácido oleico (18:1 n9 cis).

Tabla 2. Resultados de la extracción de lípidos por GC-MS de *H. pluvialis* (método 175b 1,5 ml/min split 1 10 agilent)

TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁCIDO GRASO	CONTENIDO %
11,603	Ác. Palmítico (16:0)	25,8 ± 1,3
14,563	Ác. Esteárico (18:0)	1,8 ± 0,1
15,623	Ác. Oleico (18:1 n9 cis)	21,1 ± 0,9
17,271	Ác. Linoleico (18:2 n3 cis)	19,6 ± 0,4
19,235	Ác. Linolénico (18:3 n cis)	19,2 ± 0,4

La *C. vulgaris* presentó un rendimiento total de lípidos de 3.46% ± 0.32, mucho menor que *H. pluvialis*. La PLE indicó que el contenido medio de carotenoides totales era de 31.17 ± 1.74 mg/ml. Finalmente, la GC-MS indicó que el ácido graso mayoritario presente en *C. vulgaris* era el ácido linoleico (18:2 n3 cis) seguido del ácido linolénico (18:3 n cis). (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la separación de lípidos por GC-MS de la *C. vulgaris* (método 175b 1,5 ml/min split 1 10 agilent)

TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁCIDO GRASO	CONTENIDO %
11,63	Ác. Palmítico (16:0)	20,8 ± 0,56
12,35	Ác. Palmitoleico	5,5 ± 0,2
14,55	Ác. Mirístico	1,1 ± 0,6
17,32	Ác. Linoléico (18:2 n3 cis)	23,1 ± 0,4
19,33	Ác. Linolénico (18:3 n cis)	22,7 ± 0,4

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos en el cromatograma de la *A. platensis*; donde se identificó el ácido graso mayoritario ácido palmítico seguido por el ácido linolénico. Por último, se realizó la analítica de la *A. platensis* para evaluar la composición nutricional de la misma, ya que finalmente fue la que mejor rendimiento de producción obtuvo en el proceso de crecimiento de microalgas (Tabla 4). También se vio la composición nutricional de la *A. platensis*. (Tabla 5)

Tabla 4. Resultados de la separación de lípidos por GC-MS de la *A.platensis* (Método 175B 1,5 ml/min split 1 10 agilent)

TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁCIDO GRASO	CONTENIDO %
11,605	Ác. Palmítico (16:0)	52%
12,536	Ác. Palmitoleico (16:1 n-7)	5,3%
15,586	Ác. Oleico (18:1 n9 cis)	2,52%
17,228	Ác. Linolénico (18:2 n-6 cis)	20,3%
18,456	Ác. Linoleico (18:3)	18,7%

Tabla 5. Composición nutricional de *A. platensis*

COMPUESTO PRINCIPAL	COMPUESTO ESPECIFICO	CANTIDAD (g)
Grasa (g/100g)		4,4
Perfil de ácidos grasos	Ác. grasos saturados (g/100g grasa)	40,6
	Ác. grasos monosaturados (g/100g grasa)	11,42
	Ác. grasos poliinsaturados (g/100g grasa)	41,59
	Ác. grasos trans totales (g/100g grasa)	6,34
	Ác. grasos omega 3 (g/100g grasa)	2,25
	Ác. grasos omega 6 (g/100g grasa)	39,34
	Hidratos de carbono(g/100g)	
Reparto de azúcares	Fructosa (g/100g)	<0,10
	Glucosa (g/100g)	<0,10
	Sacarosa (g/100g)	0,19
	Maltosa (g/100g)	<0,10
	Lactosa (g/100g)	<0,10
Fibra alimentaria (g/100g)		9,8
Proteína (g/100g)		53,7
Ficocianinas	Ficocianina-A (mg/g)	7,95
	Ficocianina-C (mg/g)	30,646

Como se puede ver en el gráfico de barras (Figura 13) la concentración de carotenoides totales es mayor en la *C. vulgaris* que en la muestra de *A.platensis*; mientras que en el caso de la concentración total de clorofila vemos una mayor concentración en *A.platensis* que en la *C. vulgaris*.

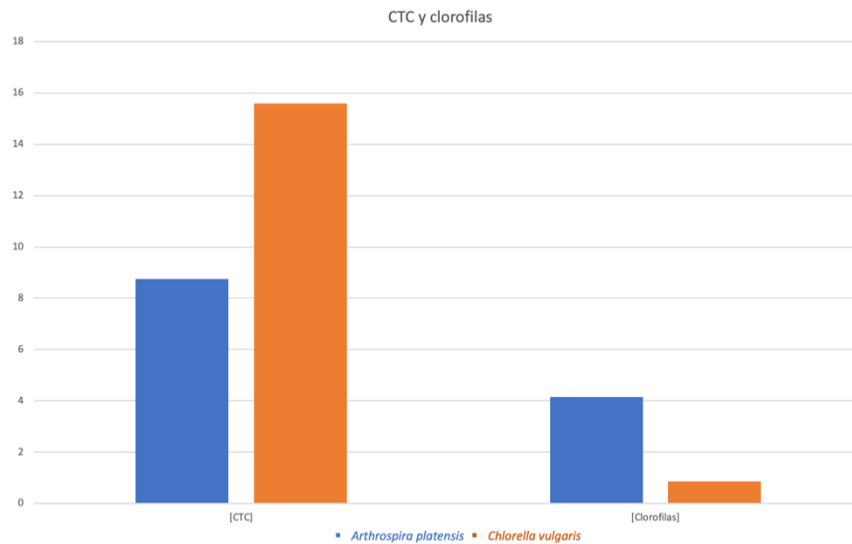


Figura 13. Contenido en carotenoides totales (CTC) y clorofilas en la muestra de *A. platensis* y en la muestra de *C. vulgaris*.

#### 5.4 Formulación preliminar y análisis sensorial de las bebidas y los geles

Se realizó una **sesión de ideación con chefs para identificar potenciales sabores o combinaciones de ingredientes para desarrollar 5 prototipos de bebidas y geles innovadores**. Sus características principales han sido, en el caso de las bebidas, evitar la decantación de la ficocianina mientras que en los geles encontrar el punto de densidad del producto y también en este caso evitar que la ficocianina pierda el color. En la primera parte de la ideación los chefs realizaron una lluvia de ideas sobre posibles aromas dulces, cítricos y frescos para las bebidas y geles. A continuación, el equipo de chefs trabajó en generar posibles combinaciones de aromas interesantes, innovadoras y poco habituales para el usuario. En total, los chefs realizaron 12 posibles combinaciones entre aromas dulces, cítricos y frescos:

Cassis-Vainilla; Chocolate-Café; Açai-Eucalipto; Limón-Hierba luisa; Toffe-Regaliz; Naranja sanguínea; Mandarina-Lima; Grosella-Pomelo; Vainilla-Café; Manzana-Lima; Limón; Melocotón-Menta.

Las fuentes utilizadas para estas combinaciones y formulaciones se buscaron en Web y Scopus.

A continuación, se hicieron los análisis preliminares para determinar ventajas e inconvenientes de la adición de la espirulina y de la ficocianina. Seguidamente se optó por la pasteurización (consiste en el tratamiento del calor de un producto para matar todas las

bacterias patógenas y reducir la actividad enzimática) como método de conservación y se midió el pH. En la Tabla 7 se informan de los resultados comparando ventajas e inconvenientes tanto de la espirulina como de la ficocianina. Además, se eligió la pasteurización para no dañar el producto en cuanto es para alimentación.

Sucesivamente al proceso de desarrollo de las fórmulas, se realizó un estudio de mercado; también con una búsqueda bibliográfica partiendo de los grupos focales con consumidores para determinar los ingredientes que deban estar dentro de la formulación.

El Proceso de elaboración de una de las **bebidas isotónicas** fue el siguiente:

- a) Se mezclan todos los azúcares: azúcar blanco, dextrosa, maltodextrina y fructosa.
- b) Se añade el agua al tanque de mezclado y se mezcla en frío durante 4 minutos.
- c) A continuación, se añade el resto de los ingredientes manteniendo la bebida fría: BCAAs (aminoácidos ramificados), ácido cítrico, bicarbonato de sodio, ficocianina, aromas, tripolifosfato sódico y el citrato de sodio.
- d) Se mezcla durante 4 minutos a velocidad baja para evitar introducir aire a la mezcla hasta que todos los elementos estén integrados.
- e) Filtrado.
- f) Envasado.

En el diagrama de flujo que se muestra en la Figura 14 se muestra el proceso de producción de las bebidas deportivas independientemente de la variante de sabor.



Figura 14. Diagrama de flujo de la producción de la bebida

El Proceso de elaboración de otras **bebidas isotónicas** fue el siguiente:

- a) Se mezclan todos los azúcares: azúcar blanco, dextrosa, maltodextrina y fructosa.
- b) Se añade el agua al tanque de mezclado y se mezcla en frío durante 4 minutos.
- c) A continuación, se añade el resto de los ingredientes manteniendo la bebida fría: BCAAs,

ácido cítrico, bicarbonato de sodio, ficocianina, tripolifosfato sódico y el citrato de sodio.

d) Se mezcla durante 4 minutos a velocidad baja para evitar introducir aire a la mezcla hasta que todos los elementos estén integrados.

e) Se añade el aroma durante el mezclado.

f) Filtrado.

g) Envasado.

El Proceso de elaboración de **los geles deportivos** fue el siguiente:

a) Se mezclan todos los jarabes: jarabe de glucosa y jarabe de fructosa.

b) Se añade el agua al tanque de mezclado y se mezcla en frío durante 4 minutos.

c) A continuación, se añade el resto de los ingredientes manteniendo la bebida fría:

maltodextrina, BCAAs, ácido cítrico, ficocianina y Helaphos P (tripolifosfato sódico).

d) Se mezcla durante 4 minutos a velocidad baja para evitar introducir aire a la mezcla hasta que todos los elementos estén integrados.

e) Se añade el aroma durante el mezclado.

f) Filtrado.

g) Envasado

En el diagrama de flujo de la Figura 15 se muestra el proceso de producción de los geles deportivos independientemente de la variante de sabor.

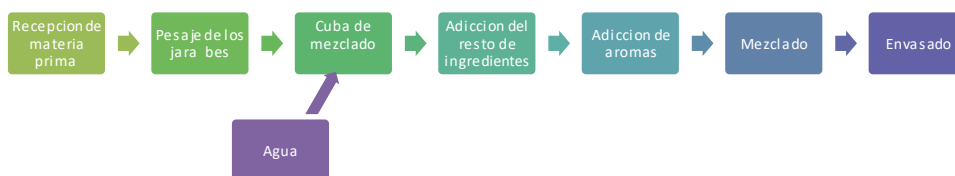


Figura 15. Diagrama de flujo del proceso de producción del gel deportivo

Finalizado tanto el proceso de elaboración como las fórmulas de las bebidas y de geles, el equipo de análisis sensorial realizó un panel focal con el equipo de chefs y gastrónomos

especializados en productos y técnicas culinarias del centro ( $n \geq 8$ ) para investigar el sabor de los diferentes prototipos, así como de las correcciones a aplicar para mejorar el perfil de aceptación del producto.

En paralelo a la evaluación sensorial, se analizaron fisicoquímicamente las principales características de las bebidas y los geles. Los resultados de los análisis de los productos se muestran en las Tablas de 14 a 19 en el apartado de Formulación desarrollo de bebidas y geles.

### 5.5 Estudio de aceptación de los geles y bebidas isotónicas.

El objetivo principal es poder determinar la percepción, aceptación e interés generado por los prototipos de bebidas y geles elaborados a partir de ficocianina.

Para cumplir este propósito se llevó a cabo un estudio cuantitativo de consumidores de tipo Home-Use-Test. Los Home-Use-Test son estudios de consumidores que se llevan a cabo en contexto real del hogar. Cada usuario recibe un set de muestras con sus instrucciones donde se le explica el procedimiento de la prueba, así como el formulario o cuestionario que deben de cubrir (Figura 16). Además, para transmitir al usuario el concepto de que se trataba de un producto elaborado a partir de ingredientes naturales como la ficocianina, la hoja de instrucciones incluía el enlace a un video que contextualizaba al consumidor sobre que la procedencia del color azul de las bebidas se debía a un compuesto natural presente en las microalgas como la *A.platensis* (espirulina), y que es la ficocianina.



Figura 16. Fotografía de los sets de bebidas y geles distribuidos entre los participantes

Para el proyecto se reclutaron un total de 60 participantes, todos ellos deportistas y consumidores habituales de suplementos como las bebidas y los geles deportivos. Los voluntarios que participaron fueron reclutados a partir de la base de datos de consumidores de Basque Culinary Center Innovación y en colaboración con Cianoalgae SL.

El cuestionario que se diseñó para este estudio constaba de: 1) una pregunta para medir la aceptación del producto empleando hedónica de 9 puntos con incrementos de 1 punto, siendo 1 = me disgusta extremadamente, 5 = ni me gusta ni me disgusta, y 9 = me gusta extremadamente, 2) preguntas tipo Likert de 5 puntos para hacer un diagnóstico de los atributos sensoriales de sabor general, de dulzor y de textura en geles (valores 1 y 2 indican que el atributo es insuficiente, 3 indica que se encuentra en el punto correcto y adecuado para el consumidor, y valores 4 y 5 indican que el atributo evaluado se encuentra en exceso para el gusto del consumidor), 3) preguntas abiertas para investigar la percepción del sabor del producto y del listado de ingredientes y comentarios generales. Para recoger los datos del cuestionario (**recogido en Anexo**), este se programó en el software RedJade® (RedJade Sensory Solutions, LLC, Palo Alto, USA)

## 5.6 Formulación y desarrollo de bebidas y geles

Se realizó una **sesión de ideación con chefs para identificar potenciales sabores o combinaciones de ingredientes para desarrollar 5 prototipos de bebidas y geles innovadores.**

En la sesión de ideación, los chefs coincidieron con los consumidores, en que, debido al alto contenido de glucosa de este tipo de productos, lo interesante sería combinarlas con aromas que fueran ácidos y frescos a nivel aromático para facilitar la bebida del producto y que no generase sed a los deportistas.

La Tabla 6 recoge los aromas que se mencionaron por el equipo de chefs.



Tabla 6. Aromas dulces, cítricos y frescos obtenidos durante la sesión de ideación con los chef

Aromas dulces	Aromas cítricos	Aromas frescos
Cassis	Naranja	Menta
Grosella	Naranja sanguina	Eucalipto
Vainilla	Limón	Regaliz
Melocotón	Lima	Hinojo
Chocolate	Pomelo	Hierba luisa
Caramelo	Mandarina	Hierba buena
Toffe	Manzana Granny Smith	
Café		
Açaí		

A continuación, el equipo de chefs trabajó en generar posibles combinaciones de aromas interesantes, innovadoras y poco habituales para el usuario. En total, los chefs realizaron un total de 12 posibles combinaciones entre aromas dulces, cítricos y frescos.

Tras la elaboración del listado de posibles combinaciones aromáticas, el equipo de chefs priorizó aquellas ideas que se adaptasen a un público más general, es decir que fueran reconocibles, pero que a la vez no fueran sabores clásicos y recurrentes en este tipo de productos. Las **combinaciones seleccionadas** para los prototipos fueron Cassis – Vainilla, Naranja sanguina, Melocotón – Menta, Manzana – Lima, y Limón.

Una vez elegidos los sabores con potencial interés para ser incluidos en los prototipos y geles, el equipo culinario de BCC (Basque Culinary Center) Innovation trabajó en **elaborar las formulaciones para los posibles prototipos de geles y bebidas isotónicas**.

Debido al resultado positivo obtenido en la producción de espirulina en cuanto a biomasa y rendimiento, se seleccionó esta microalga para la elaboración de los prototipos. Así mismo, se trabajó con el extracto de ficocianina.

En primer lugar, se seleccionaron los ingredientes funcionales espirulina y ficocianina para la elaboración de los posibles geles y bebidas isotónicas. Para determinar el límite de espirulina y ficocianina a añadir, se realizó una búsqueda bibliográfica en las bases de datos de publicaciones científicas como Web of Knowledge y Scopus. En cuanto a espirulina, se ha demostrado que dosis de 80/90 g/día no resulta tóxico para el organismo,

ni por acumulación de metales pesados, ni por acumulación de ácido úrico. (Santillan, 1974)

Por otro lado, en cuanto a la ficocianina, la única regulación conocida al respecto es la proporcionada por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA). Esta indica que la dosis de 1 g de ficocianina al día se reconoce generalmente como segura. (Keefe, 2012)

Se realizaron varias pruebas en los laboratorios para determinar las ventajas e inconvenientes del uso de espirulina, así como de ficocianina (Tabla 7).

Tabla 7. Ventajas e inconvenientes de *A. platensis* y ficocianina

INGREDIENTE	VENTAJAS	INCONVENIENTES
<i>Arthrospira platensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presenta un color atractivo.</li> <li>• Sus beneficios para el rendimiento deportivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ No diluye bien</li> <li>○ Al tiempo precipita creando posos.</li> <li>○ Presenta un aroma y un sabor de origen “marino” desagradable</li> <li>○ Se oxida al aplicar temperatura</li> </ul>
Ficocianina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presenta un color atractivo</li> <li>• Se diluye perfectamente sin crear posos</li> <li>• No presenta ni olor ni sabor, lo cual facilita el saborizar de la bebida.</li> <li>• Sus beneficios para el rendimiento deportivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Se oxida al aplicar temperatura</li> </ul>

Aunque ambas tienen un color atractivo, y su consumo supone un beneficio para el rendimiento deportivo, es importante destacar que la ficocianina es más soluble que la espirulina, no precipita y no tiene sabores ni olores extraños.

Después del testeado en laboratorios, y comparar las ventajas y desventajas de la aplicación en bebidas en base agua de *A. platensis* (Figura 17) y ficocianina (Figura 18), el equipo de chefs de BCC Innovation tomó la decisión de trabajar con la ficocianina ya que posee los mismos beneficios en cuanto a propiedades funcionales, pero carece del sabor y olor marino de la espirulina. De la misma manera, la ficocianina se diluye en los líquidos

inmediatamente y no crea ningún sedimento pasado un tiempo considerable de reposo. Por otro lado, debido a que el color que presentan tanto las bebidas como los geles suele ser eléctrico o bastante vivo, el equipo de trabajo consideró que podía resultar más interesante al usuario la bebida con ficocianina.

Una vez definido el ingrediente con propiedades funcionales de interés para elaborar los prototipos, se realizaron diferentes pruebas para evaluar la resistencia del color de las bebidas de ficocianina a la temperatura, así como al paso del tiempo.

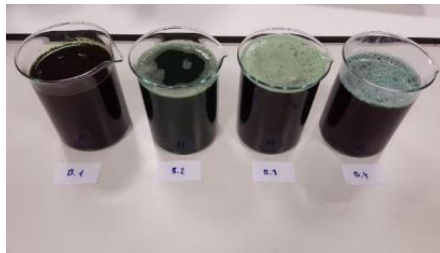


Figura 17. Bebidas elaboradas con espirulina

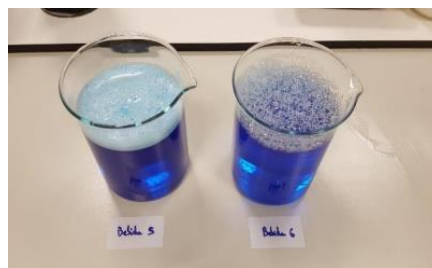


Figura 18. Bebidas elaboradas con ficocianina

Una vez desarrollados los primeros prototipos, se optó por realizar una pasteurización como método de conservación. Este tipo de prueba reveló que el color azul brillante inicial se perdía instantáneamente al aplicar temperatura. En la Figura 19 se puede observar que la bebida sin tratamiento térmico (izquierda) tenía un color azul mucho más intenso y nada verdoso en comparación con las bebidas con tratamiento térmico (muestra central y derecha). Debido al problema de oxidación del color, se decidió no tratar térmicamente las bebidas.



Figura 19. Bebidas de ficocianina sin tratamiento térmico (izquierda) y con diferentes tratamientos térmicos (centro y derecha)

Como alternativa para evitar la contaminación de los productos, así como para alargar la vida útil de los mismos, se buscaron ingredientes tecnológicos y aditivos para preservar la bebida durante su estocaje. A continuación, se indican los seleccionados tras la realización de múltiples prototipos y pruebas organolépticas.

En primer lugar, se aumentó la acidez de la bebida mediante la bajada de pH con ácido cítrico. Además de sus propiedades conservantes, sensorialmente aportaba más frescura en boca, ayudando a disminuir la sensación “empalagosa” de dulzor, ya que las bebidas poseen un alto contenido en azúcares necesarias para el deportista. Por el mismo motivo, se añade citrato de sodio como corrector de acidez y efecto tampón para mantener el pH estable durante toda la vida útil de la muestra.

Como conservante, se añadió tripolifosfato sódico, actúa como conservador y estabilizante, puede mejorar el olor y el color en diversos productos alimenticios. Es utilizado en la formulación de chicles, refrescos, zumos y bebidas isotónicas entre otros (Ibáñez, 2003)

La cantidad empleada para la formulación de las bebidas se definió a partir del *Real decreto* 142/2002 del 1 de febrero por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.

En la segunda parte del proceso de desarrollo de las formulaciones, se realizó un estudio de mercado, así como una búsqueda bibliográfica partiendo de los resultados de los grupos focales con consumidores para determinar **los ingredientes que debían estar dentro de la formulación.**

Las bebidas deportivas deben: hidratar y prevenir la deshidratación durante la actividad deportiva, aportar sales minerales e hidratos de carbono, ya que ambas tipologías de nutrientes aumentan la absorción de agua por la combinación de sales minerales y azúcares (absorción rápida y lenta).

Las cantidades óptimas de absorción intestinal de hidratos de carbono son de 60g de glucosa (Rehrer, 2001) y hasta 90 g de maltodextrina y fructosa (Murray, 2007) por cada 600-800 mL/h de agua. Es importante tener en cuenta que la fructosa puede dar problemas gastrointestinales, por lo que no se recomienda que la bebida contenga más del 20-30% de fructosa.

Las sales minerales para añadir en bebidas deportivas contendrán electrolitos como el sodio y/o el potasio. El contenido de sodio en un individuo sano debe ser como máximo de 1610 mg al día y el de potasio 3715 mg. Teniendo en cuenta esta recomendación, las bebidas isotónicas para deportistas deberán tener un contenido en sodio entre 0.46-1.20g/L y de potasio de 78 mg K/l. (Zapata, 2018)

En cuanto a los aminoácidos, los más recomendados son los BCAAs (aminoácidos de cadena ramificada), que unen leucina, isoleucina y valina. Constituyen aproximadamente, un tercio de la proteína muscular del músculo esquelético, siendo los requerimientos medios diarios de 40 (leucina), 20 (isoleucina) y 20 (valina) mg/kg peso/día, respectivamente, para personas sanas no clasificadas como deportistas. (Kurpad, 2006)

Una vez seleccionados los ingredientes tecnológicos y los ingredientes esenciales para estas bebidas para deportistas, se procedió a la elaboración de las bebidas en los laboratorios y cocinas de BCC Innovation. A continuación, se describen los procesos e ingredientes finales para cada una de las tipologías de producto: bebidas isotónicas y geles deportivos.

La Tabla 8 muestra la fórmula de la bebida de cassis-vainilla, la Tabla 9 muestra la fórmula de la bebida de naranja, y la Tabla 10 muestra la de la bebida de melocotón y menta. Estas fórmulas son las definitivas después de haber realizado las modificaciones pertinentes a partir de los resultados obtenidos en el estudio anterior.

Tabla 8. Fórmula bebida cassis-vainilla

Ingredientes	%	1000g
Agua	90,51	905,10
Azúcar	5,25	52,50
Dextrosa	1,45	14,48
Maltodextrina	0,91	9,05
BCAAs	0,58	5,79
Fructosa	0,36	3,62
Ácido cítrico	0,29	2,90

Aroma cassis	0,18	1,81
Aroma vainilla	0,18	1,81
Bicarbonato de sodio	0,15	1,54
Ficocianina	0,07	0,72
Helaphos P (tripolifosfato sódico)	0,02	0,23
Citrato de sodio	0,05	0,45
Total	100,00	1000,00

Tabla 9. Fórmula bebida naranja

Ingredientes	%	1000g
Agua	90,83	908,29
Azúcar	5,27	52,68
Dextrosa	1,45	14,53
Maltodextrina	0,91	9,08
BCAAs	0,58	5,81
Fructosa	0,36	3,63
Ácido cítrico	0,29	2,91
Bicarbonato de sodio	0,15	1,54
Aroma de naranja	0,01	0,11
Ficocianina	0,07	0,73
Helaphos P (tripolifosfato sódico)	0,02	0,23
Citrato de sodio	0,05	0,45
Total	100,00	1000,00

Tabla 10. Fórmula bebida melocotón-menta

Ingredientes	%	1000g
Agua	90,62	906,25
Azúcar	5,26	52,56
Dextrosa	1,45	14,50
Maltodextrina	0,91	9,06
BCAAs	0,58	5,80
Fructosa	0,36	3,62
Ácido cítrico	0,29	2,90
Aroma melocotón	0,18	1,81

Bicarbonato de sodio	0,15	1,54
Ficocianina	0,07	0,72
Extracto seco de menta	0,05	0,54
Helaphos P (tripolifosfato sódico)	0,02	0,23
Citrato de sodio	0,05	0,45
Total	100,00	1000,00

La Tabla 11 muestra la fórmula del gel de manzana-lima y la Tabla 12 muestra la fórmula del gel de limón. Estas fórmulas son las definitivas después de haber realizado las modificaciones pertinentes a partir de los resultados obtenidos en el estudio de consumidores.

Tabla 11. Fórmula gel manzana-lima

Ingredientes	%	1000g
Jarabe de glucosa	43,53	435,27
Jarabe de fructosa	29,02	290,18
Agua	23,21	232,14
Maltodextrina	2,90	29,02
BCAAs	0,62	6,19
Aroma de manzana	0,29	2,90
Ácido cítrico	0,27	2,71
Ficocianina	0,08	0,77
Aroma de lima	0,06	0,58
Helaphos P (tripolifosfato sódico)	0,02	0,24
Total	100,00	1000,00

Tabla 12. Fórmula gel limón

Ingredientes	%	1000g
Jarabe de glucosa	43,65	436,53
Jarabe de fructosa	29,10	291,02
Agua	23,28	232,82
Maltodextrina	2,91	29,10
BCAAs	0,62	6,21
Ácido cítrico	0,27	2,72
Ficocianina	0,08	0,78

---

Aroma de limón	0,06	0,58
Helaphos P (tripolifosfato sódico)	0,02	0,24
Total	100,00	1000,00

---



Una vez definidos tanto el proceso de elaboración, como las fórmulas de las bebidas y de los geles, el equipo de análisis sensorial realizó un **panel focal** con el equipo de chefs y gastrónomos especializados en producto y técnicas culinarias del centro ( $n \geq 8$ ) para indagar sobre el **sabor de los diferentes prototipos, así como de las correcciones a aplicar** para mejorar el perfil de aceptación del producto.

En general, los sabores escogidos tuvieron un impacto positivo en los chefs y gastrónomos. Como punto negativo, todos los participantes indicaron que las muestras tenían un excesivo dulzor debido al alto contenido en hidratos de carbono (azúcares libres) en su formulación.

Puesto que ese contenido en azúcar no era posible rebajarlo, ya que estaba ajustado a las necesidades de las actividades de alto rendimiento deportivo como el running, las carreras de alta montaña o los triatlones, los chefs sugirieron aumentar la concentración de ácido cítrico para así disminuir la sensación de dulzor en las muestras. Por otro lado, se recomendó subir la concentración aromática de cítricos en las diferentes bebidas/geles que los contenían para obtener el mismo efecto de disminución percibida del dulzor que con la adición de ácido cítrico.

Las fórmulas presentadas en las Tablas 8 a 12 recogen las cantidades e ingredientes definitivos tras la reformulación realizada después del panel focal. Con la composición de la Tabla 13 no se nota una diferencia significativa de los azúcares en las diferentes muestras, sin embargo, en la Tabla 14 notamos una diferencia del pH en los geles y en las bebidas con limón.

En la Tabla 15 se recogen los datos relativos al color combinando varios sabores, en la Tabla 16 se recogen los datos de acidez de las combinaciones donde se aprecia que el sabor con limón tiene mayor acidez respecto a las demás y en la Tabla 18 se muestra los grados °Brix que sirven para determinar la cantidad de sólidos solubles disueltos en un líquido.

Tabla 13. Composición de azúcares de las bebidas madre y variantes de sabor, y geles madre y variantes de sabor. La letra B. indica la bebida y G. el gel

Muestra	mg/g Glucosa		g/L Fructosa		mg/g Sacarosa		mg Maltosa/g gel	
	Media	DS	Media	DS	Media		Media	DS
B. Madre g/L	16,000	0,022	6,635	0,025	54,047	ND	ND	ND
	16,226	0,109	7,039	0,081	53,392	ND	ND	ND
B. Cassís-Vainilla g/L								
B. Melocotón-Menta g/L	16,297	0,151	6,978	0,112	53,907	ND	ND	ND
B. Naranja g/L	15,848	0,037	6,813	0,085	52,062	ND	ND	ND
G. Madre mg/g	482,838	0,509	ND	ND	235,390	343,992	349,125	7,260
G. Limón mg/g	479,222	0,101	ND	ND	230,340	355,293	354,879	0,585
G. Lima-Manzana mg/g	491,256	0,666	ND	ND	231,246	363,933	364,897	1,364

Tabla 14. pH de las bebidas madre y variantes de sabor, y geles madre y variantes de sabor

Muestra	Media	DS
B. Cassís-Vainilla	4,51	0,03
B. Melocotón-Menta	4,49	0,03
B. Naranja	4,52	0,03
B. Madre	4,61	0,02
G. Limón	3,15	0,03
G. Lima-Manzana	3,14	0,06
G. madre	3,00	0,01

Tabla 15. Coordenadas CIELAB de color de las bebidas madre y variantes de sabor y geles madre y variantes de sabor

Muestra	Media L*	DS L*	Media a*	DS a*	Media b*	DS b*
B. Cassís-Vainilla	31,118	0,004	-1,326	0,043	-22,754	0,017
B. Melocotón-Menta	32,054	0,024	-1,842	0,072	-27,174	0,023
B. Naranja	33,938	0,013	2,780	0,047	-34,320	0,010
B. Madre	34,068	0,013	2,992	0,049	-34,764	0,023
G. Limón	33,864	0,011	-8,748	0,045	-26,746	0,015
G. Lima-Manzana	33,892	0,011	-8,648	0,013	-26,734	0,015
G. madre	33,680	0,020	-8,786	0,086	-26,608	0,033

Tabla 16. Porcentaje de acidez total (g-ácido/100ml)

Muestra	Media	DS
B. Cassís-Vainilla	0,27	0,03
B. Melocotón-Menta	0,26	0,00
B. Naranja	0,26	0,00
B. Madre	0,24	0,01
G. Limón	0,44	0,04
G. Lima-Manzana	0,40	0,00
G. madre	0,43	0,00

Tabla 17. Sólidos solubles totales (°brix) de las bebidas madre y variantes de sabor y geles madre y variantes de sabor

Muestra	°Brix	°Brix
B. Cassís-Vainilla	9,25	0,07
B. Melocotón-Menta	9,25	0,07
B. Naranja	9,1	0,00
B. Madre	9	0,00
G. Limón	54	0,00
G. Lima-Manzana	54	0,00
G. madre	54	0,00

## 5.7 Estudio de la percepción del consumidor de los prototipos desarrollados

Los datos de HUT correspondientes al estudio de los geles y bebidas isotónicas se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) y el *post-hoc* test Tukey LSD. Las Tablas 18 y 19, así como las Figuras 20 a 23 muestran los resultados correspondientes a las muestras de bebidas y geles deportivos respectivamente.

Tabla 18. Medias y p-valores resultantes del análisis de datos de aceptación JAR (Just-About-Right) de sabor y JAR de dulzor de los prototipos de bebidas evaluados resultante del análisis Anova y Turkey

Bebida	Aceptación	JAR Sabor	JAR-JAT Dulzor
B Cassís vainilla	6,281 a	2,875 a	3,344 a
B Melocotón menta	5,484 ab	3,032 a	3,129 a
B Naranja	4,516	2,774 a	2,903 a
p-value	0,001	0,552	0,141
Significativo	Si	No	No

Las letras a y ab en la Tabla 18 son del test de Turkey e indican si hay diferencias significativas en la comparación de los sabores. Si comparten las dos letras no hay diferencia significativa, sin embargo, si no comparten letras entonces si hay diferencias significativas.

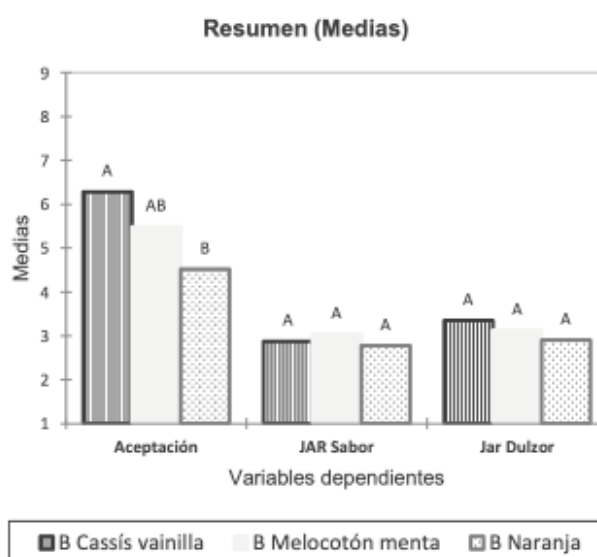


Figura 20. Gráfico de medias de datos de aceptación, JAR de sabor y JAR de dulzor de los prototipos de bebidas evaluadas

Según el análisis ANOVA y el *post-hoc* test Tukey LSD de las bebidas deportivas, Tabla 18 y Figura 20, los consumidores detectaron diferencias significativas entre bebidas en cuanto a la aceptación, gustando unas significativamente más que otras. En cambio, en cuanto al diagnóstico de atributos JAR, no se encontraron diferencias significativas, lo que indica que tanto el sabor como el dulzor de las bebidas se encuentra en el punto justo para el usuario (puntuaciones próximas a 3).

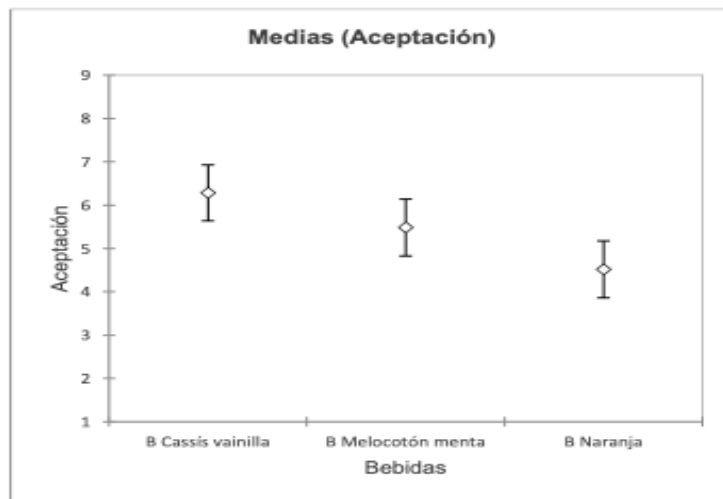


Figura 21. Gráfico de medias y desviación de la aceptación de los diferentes prototipos de bebidas deportivas

Tanto en la Tabla 18 como en la Figura 21, se puede observar que el prototipo que más gustó a los consumidores fue el de Cassis-Vainilla, ya que obtuvo una puntuación media superior a 6, lo que se traduce en la escala hedónica a “Me gusta ligeramente”.

Por otro lado, la muestra de Naranja fue la que menos gustó. Esto se puede deber a que se trata del sabor más habitual en el mercado para este tipo de productos, y que, por lo tanto, los usuarios prefieren sabores más innovadores para las bebidas deportivas.

La percepción del sabor, recogida a través de una pregunta abierta, fue la siguiente para cada una de las bebidas:

- La bebida deportiva de Cassís-Vainilla evocaba al consumidor sabores vegetales-florales de eucalipto, violeta y bosque, y sabores frutales de arándanos, cereza, fresa, frambuesa, mora, limón, melocotón y piña. Así mismo, se identificaron sabores menos agradables y artificiales como el metálico o medicinal.
- La bebida deportiva de Melocotón-Menta se describió con sabor a frutas de hueso como la cereza, ciruela y melocotón, y con sabores refrescantes a menta que recordaban a dentífrico, colutorio y/o bebidas isotónicas similares a Powerade®. En cuanto a los defectos detectados, algunos consumidores encontraron sabores que recordaban a medicina o a gel de baño, y otros como metálico, amargo y astringente.
- La bebida deportiva de naranja fue la peor valorada. Aunque recordaba a *Fanta*® de naranja, mandarina o cítricos, otros la encontraron medicinal, excesivamente dulce y con un final amargo. El comentario más repetido es que no gusta el olor ni el sabor del producto.

En cuanto a los geles deportivos, el análisis ANOVA y el *post-hoc* test Tukey LSD indicaron que no había diferencias significativas entre geles en cuanto a la aceptación del producto o al diagnóstico de atributos Tabla 19 y Figura 23.

Tabla 19. Medias y p-valores resultantes del análisis de datos de aceptación JAR de sabor, JAR de dulzor y JAR de textura de los prototipos de geles deportivos evaluados resultante del análisis Anova y Turkey

Categoría	Aceptación	JAR sabor	JAR dulzor	JAR textura
G-Lima manzana	6,167 a	3,300 a	3,633 a	3,467 a
G-Limón	5,333 a	3,133 a	3,567 a	3,367 a
p-value	0,136	0,427	0,769	0,636
Significativo	No	No	No	No

Tanto en la Tabla 19 como en la Figura 23, se puede observar que el gel de lima-manzana recibió puntuaciones en torno a 6, lo que se traduce en la escala hedónica a “Me gusta ligeramente”, mientras que el gel de limón obtuvo una puntuación de aproximadamente 5, lo que corresponde con el anclaje “Ni me gusta, ni me disgusta”.

Es importante mencionar que, en el diagnóstico de atributos en cuanto al dulzor, las puntuaciones se encontraban por encima de 3,5, lo que indicaba que los geles se percibieron más dulces de lo que a los consumidores les gustaría.

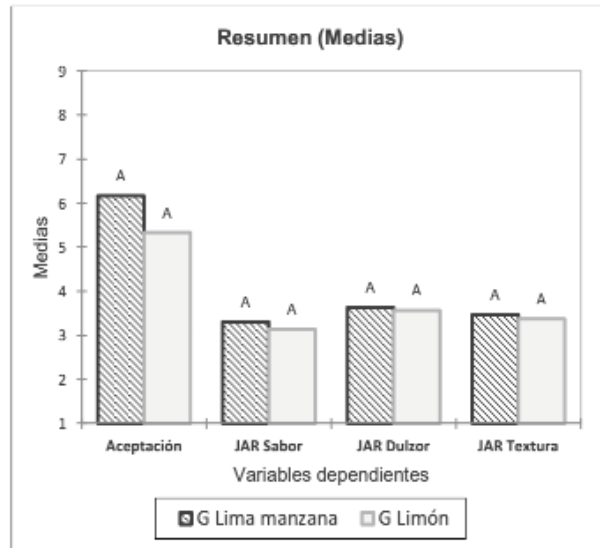


Figura 22. Gráfico de medias de datos de aceptación, JAR de sabor, JAR de textura y JAR de dulzor de los prototipos de geles evaluados

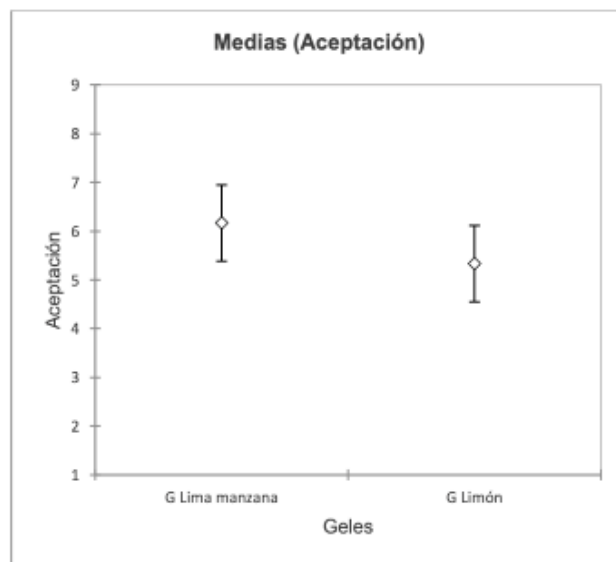


Figura 23. Gráfico de medias y desviación de la aceptación de los diferentes prototipos de geles deportivos

En cuanto a la percepción general del sabor de los geles, recogida a través de la opinión de los participantes, fue la siguiente:

- El gel deportivo de lima-manzana resultó dulce, con una textura algo viscosa. Aunque tenía aromas principalmente cítricos que recordaban a limón y a lima, también se encontraron sabores manzana, kiwi y melón.
- El gel deportivo de limón presentaba un claro sabor a limón, miel y caramelo. Aunque resultó rico según los comentarios, podía llegar a resultar demasiado dulce para consumir durante la actividad deportiva.

Por último, el análisis de las etiquetas por parte de los consumidores indicó que sugerían bajar el contenido en glucosa de las bebidas y la adición de componentes en beneficio a la salud del deportista, como aminoácidos o suplementos.

Los aminoácidos se añadieron en la etapa final del proyecto (BCAAs), siendo el listado de ingredientes el final y corregido tras el estudio de consumidores. Por otro lado, se sugirió aumentar el contenido en ficocianina, pero no se atendió esa demanda para procurar un consumo seguro del compuesto (1 g/día ficocianina) (Keefe, 2012),

## 5.8 Pasos a seguir para adaptar los procesos a la Química Verde

Se consideran técnicas verdes aquellas que tienen mínimo impacto ambiental, son respetuosas con el medio ambiente y no generan residuos. Su principal inconveniente es que son muy caras y no son escalables. (Barberio, 2019)

A continuación, se describen algunas técnicas que se barajaron para la extracción de ficocianina.

La técnica de líquidos presurizados consiste en bombear un disolvente hacia la celda de extracción (la que se encuentra en un horno), que se calienta hasta alcanzar la presión deseada.

Durante el período de estabilización, una válvula de alivio abre y cierra para mantener la presión y temperatura en la celda. Una vez alcanzadas las condiciones de temperatura y presión procede una extracción estática (10-30 min). Finalmente, el disolvente con el extracto se recoge en un vial. (Gallego y col., 2020)

La extracción con fluidos supercríticos es una de las técnicas más conocidas en el campo de la extracción de carotenoides en el mundo de las microalgas. Es una técnica que se produce gracias a la alta solubilidad del CO<sub>2</sub> con los compuestos bioactivos como



carotenoides, clorofila y ácidos grasos, y no produce residuos. El CO<sub>2</sub> se trata con presión y temperatura para transformarlo en un fluido supercrítico, que es un fluido que se encuentra bajo ciertas condiciones de temperatura y presión superior a su punto crítico donde no se puede distinguir entre el estado gaseoso del líquido. (Mendiola León, 2008)

Otro método es poder utilizar una solución alcalina previo tratamiento con CaCl<sub>2</sub> y realizar el método de extracción con agua a baja temperatura.

### 5.9 Perspectivas futuras

En líneas futuras se estudiará la vida útil que podría tener la ficocianina a lo largo del tiempo para poder evitar el problema de la decantación o pérdida de color. Optimización de técnicas avanzadas verdes como puede ser la extracción con líquidos presurizados (PLE) o mediante fluidos supercríticos (SFE) para poder obtener compuestos bioactivos con un alto grado de pureza.

Además, se utilizarán los mejores extractos obtenidos en pruebas de actividad biológica *in vitro* o *in vivo*, así como en la elaboración de microcápsulas con interés alimentario gracias al contenido de ficocianina y lípidos de los extractos obtenidos.

## 6 CONCLUSIONES

A continuación, se exponen las principales conclusiones de este trabajo.

1. *A. platensis* es la microalga que ha tendido un mayor crecimiento respecto a las otras microalgas como *H.pluvialis* y *C.vulgaris* debido a las características de la propia microalga y a las condiciones de temperatura y pH.
2. La ficocianina se ha extraído por cromatografía de adsorción tras la lisis celular por osmosis. El rendimiento es del 8%. Ha resultado ser el mejor método para reducir los costes de extracción; es un método mecánico, pero no muy caro para este trabajo.
3. La ficocianina actúa como reductor del DPPH, es decir aumentando la concentración de ficocianina aumenta su poder antioxidante y el DPPH se reduce.
4. Mediante el método de Folch, se ha comprobado el rendimiento lipídico total de las microalgas; en caso de la *A. platensis* es del  $8 \pm \dots$  %, mientras que la *C.vulgaris* es del  $3.46 \pm \dots$  % y en *H.pluvialis* se ha visto que tiene un rendimiento  $28.31 \pm 0.71\%$  superior tanto a la *C.vulgaris* como a la *A.platensis*.
5. La composición de ácidos grasos en diferentes tipos de microalgas ha sido analizada mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS). En *A. platensis*, se observó que el ácido graso predominante es el ácido palmítico, representando el 52% del total, seguido por el ácido linolénico con un 20,3%. Por otro lado, en la microalga *H. pluvialis*, el análisis mediante GC-MS reveló una concentración mayor de ácido palmítico, alcanzando un 25,8%, seguido del ácido oleico con un 21,1%. En cuanto a *C. vulgaris*, se determinó a través de la misma técnica que el ácido graso mayoritario es el ácido linoleico, representando un 23,1% del total, seguido muy de cerca por el ácido linolénico con un 22,7%.
6. La concentración total de carotenoides es mayor en la microalga *C.vulgaris* respecto a la *A.platensis*. Sin embargo, se ha comprobado que la concentración de clorofila es mayor en la microalga *A.platensis* con respecto a la *C.vulgaris*.
7. En la formulación de la bebida con ficocianina se añadió trehalosa, un disacárido, capaz de poder establecer el color tanto en la bebida como en los geles. Ha sido muy útil a la hora de crear las formulaciones para las bebidas y geles.
8. Se estudiaron diversas formulaciones, con varios sabores para preparar nuevos geles y bebidas isotónicas. Las combinaciones seleccionadas fueron: Cassis – Vainilla, Naranja sanguina, Melocotón – Menta, Manzana – Lima, y Limón. Los nuevos geles y bebidas isotónicas diseñadas tuvieron una buena valoración de las propiedades organolépticas, en una escala de 1-10 con un 6.

9. Los resultados del análisis sensorial revelan que los sabores Cassís-vainilla han sido los preferidos por los consumidores, tanto en la bebida como en los geles; en una escala de 1-10 con un 6. Por lo contrario, el sabor naranja fue calificado como el menos favorable en las bebidas con una valoración de 3,5 en una escala de 1-10.
10. En cuanto a los geles, aquellos con sabor a Lima-Manzana han sido los mejor valorados en términos de dulzor y sabor

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Barberio, R. (2019). Fluidos supercríticos y líquidos iónicos: Ventajas y aplicaciones a bajo impacto ambiental. Cartagena: Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial.
- Bhattacharya, M., & Goswam, S. (2020). Microalgae – A green multi-product biorefinery for future industrial prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101-580. doi:doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101580
- Carranco Jáuregui, M., Calvo Carrillo, M., & Pérez-Gil Romo, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Scielo Venezuela*, 61(3), 233-241.
- Ciferri, O., & Tiboni, O. (1985). The biochemistry and industrial potential of spirulina. *Annual Review Microbiology*, 39(1), 503–526. doi:10.1146/annurev.mi.39.100185.002443
- Coca, M., Barrocal, V., Lucas, S., González-Benito, G., & García-Cubero, M. (2015). Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food and Bioprocess Processing*, 94, 306-312. doi:10.1016/j.fbp.2014.03.012
- Chew, K. W. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229, 53-62.
- Czerwonka, A., Kaławaj, K., Sławińska-Brych, A., Lemieszek, M., Bartnik, M., Wojtanowski, K., Rzeski, W. (2018). Anticancer effect of the water extract of a commercial *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) product on the human lung cancer A549 cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 292-302. doi:10.1016/j.biopha.2018.06.116
- El-Sheekh, M., Daboor, S., Swelim, M., & Mohamed, S. (2014). Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis*. *Iranian Journal of Microbiology*, 6(2), 112-119.
- FAO. (2016). Food loss index from post-harvest to distribution. Retrieved mayo 2023
- FAO. (2019). The state of food and agriculture. Retrieved mayo 2023, from [www.fao.org/](http://www.fao.org/).
- Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of functional foods*, 11, 375-292.
- Fogg, G., & Thake, B. (1987). Algae cultures and phytoplankton ecology. London: 3rd edn. The University of Wisconsin Press, p. 269.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957, mayo). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Gallego, R., Martínez, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2019). Development of a green downstream process for the valorization of *porphyridium cruentum* Biomass. *Molecules*, 24(8), 1564.
- Gallego, R., Tardif, C., Parreira, C., Guerra, T., Alves, M., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2020). Simultaneous extraction and purification of fucoxanthin from *tisochrysis lutea*

- microalgae using compressed fluids. *Journal of Separation Science*, 43(9/10), 1967-1977.
- Gammone, M. A. (2015). Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin. *In Marine Drugs*, 13(4), 2196–2214.
- Hosseini, S., Shahbazizadeh, S., Khosravi, K., & Mozafari, M. (2013). Spirulina paltensis: food and function. *Current Nutrition & Food Science*, 9, 00-00.
- Ibáñez, F. T. (2003). Aditivos alimentarios. *Área de Nutrición y Bromatología*, 3-5.
- Keefe, D. M. (2012, 12 8). *Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN000424. FDA ucm335743*. Retrieved 5 2023, from Agency Response Letter GRAS: <https://www.federalregister.gov/documents/2013/08/13/2013-19550/listing-of-color-additives-exempt-from-certification-spirulina-extract>
- Konícková, R., Vanková, K., Vaníková, J., Vánová, K., Muchová, L., Subhanová, I., . . . Vítek, L. (2014). Anti-cancer effects of blue-green alga spirulina platensis, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. *Annals of Hepatology*, 13(2), 273-283. doi:10.1016/S1665-2681(19)30891-9
- Kurpad, A. V. (2006). Branched-chain amino acid requirements in healthy adult human subjects. *The Journal of nutrition*, 136(1), 256S-263S.
- Lupatini, A., Colla, L., Canan, C., & Colla, E. (2016). Potential application of microalgae spirulina platensis as a protein source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 724-732. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7987>
- Marín-Prida, J., Llópiz-Arzuaga, A., Pavón, N., Pentón-Rol, G., & Pardo-Andreu, G. (2015). Aplicaciones de la c-ficocianina: Métodos de obtención y propiedades farmacológicas/applications of c-phycoyanin: Methods of purification and pharmacological properties. *Revista de ciencias farmacéuticas y alimentarias*, 1(1), 29-43.
- Mendiola León, J. A. (2008). Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. *Digital Csic Ciencias y tecnología de Alimentos Instituto de Fermentaciones Industriales Tesis*.
- Murray, B. (2007). Hydration and physical performance. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(sup5), 542S-548S.
- Patel, A. M. (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat (Vol. 40). Protein expression and purification.
- Raposo, M., Oliveira, S., Castro, P., Bandarra, N., & Morais, R. (2012). On the utilization of microalgae for brewery effluent treatment and possible applications of the produced biomass. Retrieved mayo 2023, from Online Library: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00433.x>
- Rehrer, N. J. (2001). Fluid and electrolyte balance in ultra-endurance sport. 31(10), 701-715.

- Santillan, C. (1974). Cultivation of the spirulina for human consumption and for animal feed. *International Congress of Food Science and Technology*. Madrid, Madrid, España.
- Soni, R., Sudhakar, K., & Rana, R. (2017). Spirulina – From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 157-171.
- Steffen Braune, A. K.-G.-H. (2021, Enero). Phycocyanin from arthrospira platensis as potential anti-cancer drug: Review of In Vitro and In Vivo Studies. *Life*, 11(2).
- Usharani, G., Srinivasan, G., Sivasakth, S., & Saranraj, P. (2015). Antimicrobial activity of spirulina platensis solvent. *Advances in Biological Research*, 9(5), 292-298.
- Wan, D., Wu, Q., & Kuča, K. (2016). *Spirulina*. nutraceutical. doi:0.1016/B978-0-12-802147-7.00042-5
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., & Kuča, K. (2016) The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of spirulina: an overview. *Archives of Toxicology*, 90, 1817-1840. doi:10.1007/s00204-016-1744-5
- Wypych A., W. G. (2014). Databook of green solvents. Toronto, Ontario, Canada: ChemTec Publishing.
- Xia, S. W. (2013). Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom odontella aurita. 11, 2667-2681.
- Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q., & Zhang, C. (2013). Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom odontella aurita. *Marine Drugs*, 11(7), 2667-2681. <https://doi.org/10.3390/md11072667>
- Zapata, L. &. (2018). Bebidas energéticas e isotónicas. *Santiago:NA*.

# ANEXO. Cuestionario HUT para la evaluación de bebidas y geles deportivos

## BEBIDAS

1. A continuación, pruebe la muestra {{sample\_code}} e indique cuanto le gusta **en general** la bebida en la siguiente escala: o Me disgusta muchísimo
  - Me disgusta mucho
  - Me disgusta moderadamente o Me disgusta ligeramente
  - Ni me gusta ni me disgusta
  - Me gusta ligeramente
  - Me gusta moderadamente
  - Me gusta mucho
  - Me gusta muchísimo
  
2. Por favor, vuelve a probar la muestra e indica **cómo de apropiada considera la intensidad de sabor** en función de lo le gusta (marcando 3 cuando considere la intensidad “óptima”; 1 cuando sea demasiado baja; 5 cuando sea demasiado alta).
  - Intensidad de sabor demasiado débil
  - Un Poco débil
  - Justo la intensidad de sabor correcta
  - Un poco fuerte
  - Intensidad de sabor demasiado fuerte
  
3. Por favor, vuelve a probar la muestra e indica **como de apropiada considera la intensidad de dulzor** en función de lo le gusta (marcando 3 cuando considere la intensidad “óptima”; 1 cuando sea demasiado baja; 5 cuando sea demasiado alta).
  - Intensidad de dulzor demasiado débil
  - Un poco débil
  - Justo el dulzor correcto
  - Un poco fuerte
  - Intensidad de dulzor demasiado fuerte

4. Indica los sabores o aromas que encuentra o que le recuerda el producto:

### **ETIQUETADO BEBIDAS**

Por favor, conteste las siguientes preguntas teniendo en cuenta el etiquetado y el packaging de las **BEBIDAS**:

1. ¿Qué ingredientes busca en una bebida como las que acaba de probar?
2. El presente producto tiene el siguiente contenido en ingredientes en 50 mL:

Sacarosa (2.6 g)

Dextrosa (0.7 g)

Maltodextrina (1.8 g)

Aminoácidos leucina, isoleucina y valina (0.3 g)

Ácido cítrico (0.2 g)

Bicarbonato (0.1 g)

Ficocianina (0.1 g)

Indique qué elementos cree que faltan añadir, que deberían aumentarse o disminuirse en cuanto a azúcares/carbohidratos y proteínas/aminoácidos:



## GELES

1. A continuación, pruebe la muestra {{sample\_code}} e indique cuanto le gusta **en**

**general** la bebida en la siguiente escala: o Me disgusta muchísimo

- Me disgusta mucho
- Me disgusta moderadamente
- Me disgusta ligeramente
- Ni me gusta ni me disgusta
- Me gusta ligeramente
- Me gusta moderadamente
- Me gusta mucho
- Me gusta muchísimo

1. Por favor, vuelve a probar la muestra e indica **como de apropiada considera la intensidad de sabor** en función de lo le gusta (marcando 3 cuando considere la intensidad “óptima”; 1 cuando sea demasiado baja; 5 cuando sea demasiado alta).

- Intensidad de sabor demasiado débil
- Un poco débil
- Justo la intensidad de sabor correcta
- Un poco fuerte
- Intensidad de sabor demasiado fuerte

2. Por favor, vuelve a probar la muestra e indica **como de apropiada considera la intensidad de dulzor** en función de lo le gusta (marcando 3 cuando considere la intensidad “óptima”; 1 cuando sea demasiado baja; 5 cuando sea demasiado alta).

- Intensidad de dulzor demasiado débil
- Un poco débil
- Justo el dulzor correcto
- Un poco fuerte
- Intensidad de dulzor demasiado fuerte

3. Por favor, vuelve a probar la muestra e indica **como de apropiada considera la textura** en función de lo le gusta (marcando 3 cuando considere la textura “óptima”; 1 cuando sea demasiado líquida; 5 cuando sea demasiado viscosa).

- Demasiado líquida
- Un Poco líquida
- Justo la textura correcta
- Un poco viscosa
- Demasiado viscosa

4. Indica los sabores o aromas que encuentra o que le recuerda el producto:

#### **ETIQUETADO GELES**

1. ¿Qué ingredientes busca en un gel como los que acaba de probar?
2. El presente producto tiene el siguiente contenido en ingredientes en 50 mL:

Sacarosa y dextrosa (25.4 g)

Maltodextrina (1.8 g)

Aminoácidos leucina, isoleucina y valina (0.3 g)

Ácido cítrico (0.2 g)

Bicarbonato (0.1 g)

Ficocianina (0.1 g)

5. Indique qué elementos cree que faltan añadir, que deberían aumentarse o disminuirse en cuanto a azúcares/carbohidratos y proteínas/aminoácidos:

