



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Escuela Politécnica Superior de Linares

Trabajo Fin de Grado

**ESTABILIDAD DEL PIGMENTO
NATURAL B-PE EN ALIMENTOS
DURANTE DIFERENTES PROCESOS
DE ALMACENAMIENTO**

Alumno: Ana Rentero López

Tutor: Prof. D. Ruperto Bermejo Román
Depto.: Química Física y Analítica

Septiembre, 2020



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Escuela Politécnica Superior de Linares

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Química Industrial

ESTABILIDAD DEL PIGMENTO NATURAL B-PE EN ALIMENTOS DURANTE DIFERENTES PROCESOS DE ALMACENAMIENTO

Alumno: Ana Rentero López

Tutor: Prof. D. Ruperto Bermejo Román
Depto.: Química Física y Analítica

Firma Alumno:

Firma Tutor:

Septiembre, 2020

ÍNDICE

ÍNDICE DE IMÁGENES	3
ÍNDICE DE TABLAS:	4
ÍNDICE DE FIGURAS:	6
1 RESUMEN.....	8
2 ANTECEDENTES	11
2.1 Colorantes.....	11
2.1.1 Tipos de colorantes	11
2.1.2 Colorantes en alimentación	12
2.1.2.1 Razones para el uso de colorantes	12
2.1.2.2 Importancia de los colorantes naturales	12
2.2 Interés práctico de las microalgas en el mundo de los colorantes.....	13
2.2.1 Ventajas de las microalgas frente a cultivos convencionales	13
2.2.2 Aplicaciones de las microalgas en alimentación	14
2.3 Estudios basados en la medida del color	16
2.3.1 Medida del color	17
2.3.1.1 Condiciones que afectan a la medición del color.....	18
2.3.2 Expresión numérica del color.....	19
2.3.2.1 Espacio del color L*a*b*.....	19
2.3.3 Medida de la diferencia del color	21
2.4 Las biliproteínas como colorantes	22
2.4.1 Generalidades	22
2.4.2 Aplicaciones	25
2.4.2.1 Colorantes naturales	25
2.4.2.2 Marcadores fluorescentes	26
2.4.2.3 Otras aplicaciones.....	27
3 MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Materiales.....	30
3.1.1 Reactivos.....	30
3.1.2 Instrumentación.....	30
3.1.3 Material biológico.....	34
3.1.3.1 Microalga <i>Porphyridium cruentum</i>	34
3.1.3.2 B-PE liofilizada.....	35
3.1.3.3 Muestras de bebidas tónicas.....	35

3.2	Métodos.....	37
3.2.1	<i>Adición a las matrices alimentarias del colorante liofilizado</i>	<i>37</i>
3.2.2	<i>Cálculo de los factores de tinción</i>	<i>38</i>
3.2.3	<i>Técnicas espectroscópicas de caracterización fisicoquímica.....</i>	<i>39</i>
3.2.3.1	<i>Espectroscopía de absorción UV-visible</i>	<i>39</i>
3.2.3.2	<i>Espectrocolorimetría</i>	<i>40</i>
3.2.3.3	<i>Espectrofluorimetría.....</i>	<i>41</i>
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1	Caracterización de B-ficoeritrina (B-PE) liofilizada	43
4.1.1	<i>Espectros de absorción. Ley de Lambert-Beer</i>	<i>45</i>
4.1.2	<i>Espectros de fluorescencia. Ley de Kavanagh</i>	<i>48</i>
4.2	Caracterización B-PE extracto.....	51
4.2.1	<i>Espectros de absorción. Ley de Lambert-Beer</i>	<i>52</i>
4.2.2	<i>Espectros de fluorescencia. Ley de Kavanagh</i>	<i>55</i>
4.3	Estabilidad del colorante natural B-PE liofilizada a diferentes pH.....	58
4.3.1	<i>Espectros de absorción</i>	<i>61</i>
4.3.2	<i>Espectros de fluorescencia.....</i>	<i>62</i>
4.4	Obtención de bebidas tónicas con el colorante BPE liofilizada.....	65
4.4.1	<i>Curva de color y aproximación al color atractivo en Tónica Original</i>	<i>65</i>
4.4.2	<i>Curva de color y aproximación al color atractivo en Tónica Schweppes</i>	<i>70</i>
5	CONCLUSIONES	76
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
	ANEXO I: OBTENCIÓN DE BEBIDA TÓNICA ORIGINAL CON EL COLORANTE B-PE LIOFILIZADA Y APROXIMACIÓN COLOR ATRACTIVO.....	88
	ANEXO II: OBTENCIÓN DE BEBIDA TÓNICA SCHWEPPEES CON EL COLORANTE B-PE LIOFILIZADA Y APROXIMACIÓN COLOR ATRACTIVO	92

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 2.1. Espectro electromagnético	17
Imagen 2.2. Espacio de color CIELAB con las coordenadas L^* , a^* y b^*	20
Imagen 2.3 Espacio de color CIELAB con coordenadas a^* y b^* , con L^* constante	20
Imagen 2.4. Diferencias de color en el espacio $L^*a^*b^*$	21
Imagen 2.5. Términos para describir diferencias de color en claridad y saturación	22
Imagen 3.1. Espectrofotómetro UV-visible	31
Imagen 3.2. Espectrocolorímetro	31
Imagen 3.3. Espectrofluorímetro	32
Imagen 3.4. Instrumento para la medida del pH	33
Imagen 3.5. Balanza analítica	33
Imagen 3.6. Granatario	34
Imagen 3.7. Microalga roja <i>Porphyridium cruentum</i> liofilizada	34
Imagen 3.8. B-PE liofilizada	35
Imagen 3.9. Estructura química y aspecto visual del Rojo Allura AC (E129)	36
Imagen 3.10. Estructura química y aspecto visual de las Antocianinas (E163)	36
Imagen 4.1. Disoluciones tampón fosfato a diferentes pH	59
Imagen 4.2. Muestras de B-PE liofilizada analizadas mediante espectroscopía UV-visible y espectroscopía de fluorescencia. La B-PE liofilizada se mezcla con el tampón fosfato a diferentes pH, desde 3,01 (extremo izquierdo) hasta pH 11,98 (extremo derecho)	61
Imagen 4.3. Bebida tónica Original Yuzu (incolora, parte izquierda) y tónica Original Berries (rosa, parte derecha)	65
Imagen 4.4. Evolución del aspecto de las muestras durante el ensayo de colorimetría en Tónica Original con B-PE liofilizada	67
Imagen 4.5. Evolución del aspecto de las cubetas durante el ensayo de aproximación al color atractivo en Tónica Original con B-PE liofilizada	69
Imagen 4.6. Bebida tónica Schweppes (incolora, parte derecha) y tónica Schweppes Pink (rosa, parte izquierda)	70
Imagen 4.7. Evolución del aspecto de las cubetas durante el ensayo de colorimetría en Tónica Schweppes con B-PE liofilizada	72
Imagen 4.8. Evolución del aspecto de las cubetas durante el ensayo de aproximación al color atractivo en Tónica Schweppes con B-PE liofilizada	74

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 2.1. Comparación de la composición de alimentos y microalgas (%peso seco) (Spolaore y col., 2006).....	15
Tabla 2.2. Condiciones que afectan a la medida del color	18
Tabla 2.3. Máximos de absorción y de emisión de biliproteínas.....	23
Tabla 3.1. Colorantes de las muestras alimenticias de bebidas tónicas comerciales ensayadas con B-PE liofilizada obtenida a partir de la microalga roja <i>Porphyridium cruentum</i>	35
Tabla 3.2. Muestras ensayadas con el colorante B-PE liofilizada obtenida a partir de la microalga <i>Porphyridium cruentum</i>	38
Tabla 4.1. Disolución tampón madre de Fosfato. Medio utilizado para la disolución de B-ficoeritrina (B-PE) procedente de <i>Porphyridium cruentum</i>	43
Tabla 4.2. Cálculo de la concentración de la muestra B-PE liofilizada	44
Tabla 4.3. Caracterización de la muestra B-PE liofilizada mediante la Ley de Lambert-Beer	46
Tabla 4.4. Comparativa de los coeficientes de extinción molar en muestra B-PE liofilizada utilizada en esta Memoria y B-PE pura (Ruiz Ortega, 2012)	47
Tabla 4.5. Parámetros espectroscópicos para la obtención de los espectros de fluorescencia en la muestra B-PE liofilizada	48
Tabla 4.6. Caracterización de la muestra B-PE liofilizada mediante la Ley de Kavanagh.....	49
Tabla 4.7. Comparativa de la constante de Kavanagh en muestra B-PE liofilizada utilizada en esta Memoria y B-PE pura (Ruiz Ortega, 2012)	50
Tabla 4.8. Cálculo de la concentración de la muestra B-PE extracto	52
Tabla 4.9. Caracterización de la muestra B-PE extracto mediante la Ley de Lambert-Beer.....	53
Tabla 4.10. Comparativa de los coeficientes de extinción molar en muestra B-PE extracto y B-PE pura (Ruiz Ortega, 2012)	54
Tabla 4.11. Parámetros espectroscópicos para la obtención de los espectros de fluorescencia en la muestra B-PE extracto	55
Tabla 4.12. Caracterización de la muestra B-PE extracto mediante la Ley de Kavanagh.....	56
Tabla 4.13. Comparativa de la constante de Kavanagh en muestra B-PE extracto y B-PE pura (Ruiz Ortega, 2012)	57

Tabla 4.14. Cantidades (en gramos) de Potasio Dihidrógeno Fosfato (KH_2PO_4) y de Sodio Hidrógeno Fosfato 12-Hidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) necesarias para producir 10 mL tampón buffer fosfato 0,5 M	58
Tabla 4.15. Verificación de los diferentes pH teóricos con ayuda de un instrumento medidor de pH	60
Tabla 4.16. Parámetros establecidos para la obtención de los espectros de fluorescencia en la muestra B-PE liofilizada a diferentes pH	63
Tabla 4.17. Valores de absorbancia a $\lambda_{\text{máx}} = 544 \text{ nm}$ y valores de intensidad de fluorescencia a $\lambda_{\text{máx}} = 573 \text{ nm}$, para las disoluciones de B-PE liofilizada a diferentes pH.....	64
Tabla 4.18. Factor de tinción ensayo bebida tónica Original con el colorante natural B-PE liofilizada.....	68
Tabla 4.19. Factor de tinción ensayo bebida tónica Schweppes con el colorante natural B-PE liofilizada	73
Tabla 4.20. Ensayo curva color tónica Original con B-PE liofilizada.....	88
Tabla 4.21. Ensayo aproximación color atractivo tónica Original con B-PE liofilizada	89
Tabla 4.22. Ensayo curva color tónica Schweppes con B-PE liofilizada.....	92
Tabla 4.23. Ensayo aproximación color atractivo tónica Schweppes con B-PE liofilizada.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 4.1. Espectro UV-visible muestra B-PE liofilizada	44
Figura 4.2. Espectros de absorción de la muestra B-PE liofilizada.....	46
Figura 4.3. Ley de Lambert-Beer para la muestra B-PE liofilizada	47
Figura 4.4. Espectros de fluorescencia de la muestra B-PE liofilizada	48
Figura 4.5. Ley de Kavanagh para la muestra B-PE liofilizada.....	50
Figura 4.6. Espectro UV-visible muestra B-PE extracto	51
Figura 4.7. Espectros de absorción de la muestra B-PE extracto	53
Figura 4.8. Ley de Lambert-Beer para la muestra B-PE extracto	54
Figura 4.9. Espectros de fluorescencia de la muestra B-PE extracto	56
Figura 4.10. Ley de Kavanagh para la muestra B-PE extracto.....	57
Figura 4.11. Espectros de absorbancia de la muestra B-PE liofilizada a diferentes pH (de pH 3,01 hasta pH 11,98). La Leyenda se encuentra en la derecha.....	62
Figura 4.12. Espectros de fluorescencia de la muestra B-PE liofilizada a diferentes pH (de pH 3,01 hasta pH 11,98). La Leyenda se encuentra en la derecha.....	63
Figura 4.13. Representación de valores de absorbancia a $\lambda_{\text{máx}} = 544 \text{ nm}$ y valores de intensidad de fluorescencia a $\lambda_{\text{máx}} = 573 \text{ nm}$, para las disoluciones de B-PE liofilizada a diferentes pH. La leyenda se encuentra la zona superior.....	64
Figura 4.14. Curva de coloración bebida tónica marca Original	66
Figura 4.15. Ensayo aproximación al color atractivo bebida tónica marca Original	68
Figura 4.16. Curva de coloración bebida tónica marca Schweppes	70
Figura 4.17. Ensayo aproximación al color atractivo bebida tónica marca Schweppes	74

RESUMEN

1 RESUMEN

Actualmente, cuando se habla de las características de un alimento, se hace referencia a su textura, sabor y apariencia. Dichas cualidades influirán comercialmente en la compra de ese alimento, ya que el hecho de descartar o aceptar un producto hoy en día, está muy condicionado por su apariencia, sobre todo por su color. Debido a esto, hoy en día existen como aditivos muchos colorantes, tanto en la industria alimentaria, como en la cosmética y farmacéutica, así como en las investigaciones de diagnóstico clínico y biomédicas (Dasgupta, 2015).

Los aditivos alimentarios se definen según El Reglamento (CE) nº 1333/2008, como “toda sustancia que normalmente no se consume como alimento en sí misma ni se use como ingrediente característico de los alimentos, tenga o no valor nutritivo, cuya adición intencionada (con un fin tecnológico) a un alimento tenga por efecto que el propio aditivo se convierta directa o indirectamente en un componente del alimento”.

Los colorantes como aditivos se dividen en dos grandes grupos: colorantes naturales y colorantes sintéticos. El uso de los colorantes sintéticos en el sector alimentario está muy extendido ya que poseen gran facilidad para disolverse en agua, son económicos, estables, fáciles de usar y permiten la combinación de colores. Sin embargo, no hay que olvidar que estos colorantes son potencialmente tóxicos, alergénicos e incluso algunos carcinógenos (Weesepeol y col., 2015), por lo que la industria se ha visto obligada a buscar sustitutos de origen natural que mantengan el color de los alimentos. A pesar de las ventajas que proporcionan los colorantes naturales, este reemplazo se está viendo ralentizado debido a que generalmente los colorantes naturales requieren mayores inversiones para su obtención, además de presentar una gama de colores escasa en relación a las necesidades reales de los tipos de industrias que las requieren (Arad y col., 1992; Ruiz-Ruiz y col., 2013).

Los colorantes naturales que se obtienen a partir de organismos vivos son muy escasos, y la mayoría son poco estables a las condiciones de tratamiento térmico y conservación. Entre las fuentes más importantes de estos colorantes naturales se encuentran las algas, con un gran interés debido a su aplicación como fuente natural de pigmentos, lípidos, ácidos grasos, proteínas, polisacáridos y compuestos fenólicos. De ellas se pueden obtener pigmentos naturales como los que se encuentran en las ficobiliproteínas (Gonzalez-Ramírez y col., 2014).

El uso de cualquier colorante de origen natural requiere un conocimiento exhaustivo de su estabilidad, con el objetivo de optimizar la producción industrial, embalaje y almacenamiento de los productos coloreados (Jespersen y col., 2004).

En este Trabajo de Fin de Grado los objetivos que se pretenden alcanzar son la caracterización del colorante natural B-ficoeritrina (obtenida a partir de la especie de microalga marina *Porphyridium cruentum*) mediante técnicas espectroscópicas; el estudio de la posibilidad de utilizar la B-ficoeritrina como colorante natural en matrices alimentarias como bebidas tónicas; y la realización de un estudio mediante medidas de UV-Visible y fluorescencia de la estabilidad de la B-ficoeritrina en función del factor pH.

ANTECEDENTES

2 ANTECEDENTES

2.1 Colorantes

Los colorantes se definen como compuestos capaces de absorber determinadas longitudes de onda del espectro visible. Además, modifican el color que se percibe de los objetos o proveen de color a objetos no coloreados. Las aplicaciones de los colorantes son muy diferentes y abarcan sectores como la alimentación cosmética, industria farmacéutica, industria textil e industria de fibras o plásticos.

2.1.1 Tipos de colorantes

Los colorantes se clasifican a gran escala en dos grandes grupos en función de su procedencia:

- *Colorantes naturales.* Son aquellos que proceden de organismos vivos y/o se encuentran en la naturaleza. Tienen una ventaja principal que radica en el hecho de ser biodegradables e inocuos, sin embargo, son escasos y ofrecen una pequeña variedad de colores si se compara con la demanda del mercado. Además, tienen asociados unos costes de producción relativamente elevados.
- *Colorantes artificiales.* Son aquellos obtenidos por síntesis química. Proporcionan una amplia variedad de colores gracias a su naturaleza, aunque presentan la posibilidad de ser tóxicos y/o cancerígenos, incluso alergénicos en individuos susceptibles. Entre las principales ventajas de este tipo de colorantes destacan su estabilidad, su gran variedad de aplicaciones y sus reducidos costes.

Actualmente, existe una tendencia de reemplazar los colorantes artificiales por los de origen natural debido a la demanda por parte de los consumidores, especialmente en el sector de la alimentación, farmacia o cosmética. La existencia de estudios que corroboran el potencial tóxico de los colorantes sintéticos y la posibilidad de solucionar este problema reemplazándolos por colorantes naturales, hacen que esta demanda esté cada vez más motivada (Bermejo, 2009).

2.1.2 *Colorantes en alimentación*

2.1.2.1 Razones para el uso de colorantes

El color es considerado por parte del consumidor como uno de los atributos de calidad más importantes para la aceptación de un alimento. Así la impresión inicial de la calidad y aceptabilidad de un producto alimenticio se basa en su apariencia visual (Wrolstad y col., 2005).

Los colorantes pueden utilizarse como aditivos en los alimentos con el objetivo de compensar la pérdida de color que se produce por la exposición de los mismos a la luz, aire, temperaturas extremas, humedad o por las condiciones de almacenamiento; corregir las variaciones naturales del color o realzarlo para que sea más llamativo; o proporcionar colores atractivos a aquellos alimentos que carecen de ellos y hacer de ese color un color característico de dicho alimento. Por ejemplo, el color amarillo de la margarina o el color verde de un helado de menta.

Además de todas estas razones, otro de los motivos que llevan al uso de colorantes en la industria alimentaria se debe a las alteraciones o modificaciones del color que los variados procesos tecnológicos pueden producir en los alimentos. Tanto la elaboración, el transporte y los métodos de conservación usados en los productos alimenticios, provocan el deterioro de los colores naturales de los mismos o incluso alteración de dichos colores llegando a ocasionar la aparición de coloraciones anormales. Por ello, la industria alimentaria tiene la necesidad de alcanzar la inalterabilidad en el color de los alimentos que produce, tanto en lo que respecta a su brillo como a su uniformidad, acudiendo así a los aditivos colorantes para alcanzar dicho objetivo y ofrecer el color que considera adecuado en cada alimento.

2.1.2.2 Importancia de los colorantes naturales

Los colorantes naturales no son en absoluto una invención más de la química moderna, todo lo contrario, son descubrimientos milenarios que desde la Antigua Grecia eran ya utilizados para dar color a múltiples utensilios, principalmente a esculturas, pinturas o en la propia arquitectura. De igual modo, las telas se solían teñir con colorantes obtenidos de plantas, las cuales ya empezaban a ser cultivadas de forma masiva para satisfacer las necesidades del mercado en la antigüedad. De manera infortunada, hoy en día, los colorantes naturales han perdido espacio en la industria, siendo reemplazados por colorantes artificiales que, aunque no son peligrosos, pueden llegar a ser perjudiciales para la salud, sobre todo si se produce un abuso en el consumo de los mismos. Con el uso de colorantes

artificiales es necesario tener mucho cuidado, ya que verter cantidades mayores a las permitidas según las normativas, es probable que a largo plazo se puedan llegar a generar enfermedades como el cáncer.

Si nos centramos en los colorantes en la industria alimentaria, simplemente remitiéndonos a los motivos de salud, el uso de colorantes naturales es una de las mejores alternativas para evitar daños en la salud o enfermedades a largo plazo. No provocan ningún tipo de efecto adverso o dañino en la salud y ofrecen diferentes tonalidades en un mismo producto.

Aunque los colorantes naturales se encuentran muy distribuidos en la naturaleza, el principal obstáculo para su introducción en la industria alimentaria como agentes de pigmentación es que requieren grandes inversiones. Haciendo una visión global, se puede decir que el área de aditivos alimentarios es la más restringida, y la cantidad de colorantes alimentarios aprobados es muy limitado (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003)

2.2 Interés práctico de las microalgas en el mundo de los colorantes

Los organismos fotosintéticos como lo son las microalgas son aquellos capaces de captar la energía contenida en la luz solar y transformarla en energía química que queda almacenada.

Las microalgas contienen clorofila y diversos pigmentos entre otros componentes. Son capaces de llevar a cabo la conversión de la energía solar en energía química empleando el agua como dador final de electrones. Estos organismos son los más eficientes conversores de energía solar debido a su sencilla estructura celular, y conforman un grupo muy heterogéneo, incluyendo una extensa variedad de especies pertenecientes a diversos grupos taxonómicos, con variada morfología, tamaño y hábitat. Además, son responsables de más del 40 % de la fotosíntesis que se lleva a cabo en la Tierra, con una producción de alrededor de 10^{11} Toneladas (peso seco) de biomasa al año (Guerrero y Losada, 1989).

2.2.1 Ventajas de las microalgas frente a cultivos convencionales

Las microalgas, constituyen un grupo de microorganismos fotosintéticos extraordinariamente eficientes en la captura de la energía solar, pudiendo llegar a alcanzar rendimientos fotosintéticos muy altos (hasta el 5%) con una organización celular más simple.

La productividad de biomasa es notablemente superior a la de los cultivos agrícolas convencionales, del orden de 50 a 200 toneladas (peso seco) por hectárea y año. Los requerimientos para su crecimiento como luz, azúcares, dióxido de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio son bajos y tienen alta capacidad para producir sustancias como lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades y en cortos periodos de tiempo (Brennan y Owende, 2010).

Por otro lado, los cortos tiempos de generación permiten un rápido crecimiento y la rápida recuperación del cultivo en caso de que se produzca algún contratiempo o invasión del zooplancton, precisando su cultivo de una superficie muy pequeña en comparación con otros cultivos como por ejemplo la soja, maíz, etc.

Además, las microalgas presentan la posibilidad de crecer en aguas salobres o marinas (Verma y col., 2010) e incluso con residuos orgánicos, pudiéndose aprovechar así aguas no aptas para la agricultura tradicional ya que el consumo de nutrientes que necesitan es pequeño en comparación al gran aporte que de ellos precisa dicha agricultura (como ejemplo, el cultivo de microalgas necesita una cantidad de agua cinco veces menor que los tradicionales cultivos de alfalfa y maíz).

Con fines comerciales, la producción masiva de microalgas se lleva a cabo mayoritariamente en fotobiorreactores cerrados que operan en condiciones controladas, con el fin de obtener productividades elevadas y una biomasa más uniforme en su composición y ritmo de producción. En los últimos años se han producido avances significativos en el desarrollo y diseño de fotobiorreactores cerrados, consiguiéndose sistemas más baratos, productivos y estables. Hoy en día, debido a la mejora en los diseños con la introducción de nuevos materiales y el abaratamiento de las materias primas, existen en operación reactores cerrados de gran capacidad, con elevadas productividades de hasta $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ (Acien y col., 1998; Pulz, 2001; Verma y col., 2010).

2.2.2 Aplicaciones de las microalgas en alimentación

Actualmente, una de las principales áreas de investigación en ciencia y tecnología de los alimentos, es la extracción y caracterización de nuevos productos naturales con actividad biológica, por ejemplo, antioxidantes, antivirales, antihipertensivos, etc., que pueden contribuir al bienestar de los consumidores. En este sentido, el gran potencial de la biotecnología de microalgas abarca la producción de una gran serie de productos entre los que se incluyen alimentos saludables, productos químicos industriales y compuestos con aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, para la mayoría de esas aplicaciones el mercado está todavía en desarrollo y el uso biotecnológico de microalgas se extenderá probablemente a nuevas áreas (Olaizola, 2003; Mendiola y col., 2007; Raja y col., 2008).

Las microalgas poseen excelentes cualidades para ser utilizadas en la alimentación animal, así como en la humana. La calidad de la biomasa de microalgas viene dada por la ausencia de tejidos y órganos no aprovechables, así como por su bajo contenido en materiales estructurales. Algunas especies no tienen celulosa dura en la pared celular, lo que facilita la digestión y asimilación de las proteínas por el organismo humano, y contienen cantidades favorables de ácidos grasos insaturados, muy poco colesterol y una cantidad moderada de carbohidratos. Todos estos factores provocan una disminución en afecciones coronarias y obesidad, objetivos primarios en la sociedad moderna de nuestros días (Durand-Chastel, 1980).

Por otro lado, algunas especies de microalgas contienen un alto contenido en proteínas (pudiendo alcanzar valores de proteína bruta del orden del 50 al 70% del peso seco), carbohidratos y lípidos. Así, poseen porcentajes comparables e incluso superiores a los de otras fuentes tradicionales de proteínas ([Tabla 2.1](#)).

Tabla 2.1. Comparación de la composición de alimentos y microalgas (%peso seco)
(Spolaore y col., 2006)

Materia	PROTEÍNAS	CARBOHIDRATOS	LÍPIDOS
Levadura	39	38	1
Carne	43	1	34
Leche	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20
<i>Alga Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Alga Chlamidomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Alga Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Alga Chlorella pirenoidosa</i>	57	26	2
<i>Alga Eugleria gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Alga tetraselmis maculata</i>	52	15	3
<i>Alga Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Alga Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Alga Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Alga Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Alga Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Alga Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Alga Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Alga Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Por otra parte, el contenido en vitaminas y minerales se suma al interés alimenticio de las microalgas. Representan una fuente de casi todas las vitaminas esenciales (A, B1, B2, B6, B12, C, E, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico (B5)). Además, son ricas en pigmentos como la clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas (Spolaore y col., 2006). Como ejemplo, la especie *Porphyridium cruentum*, contiene carotenos, vitaminas, hidratos de carbono y elementos tales como Sodio, Potasio, Magnesio, Hierro, Cobre, Zinc, Cromo, Manganeso y Cobalto (Reboloso y col., 2000). La especie *Spirulina platensis* también contiene aminoácidos esenciales, vitaminas, sustancias minerales, ácidos grasos indispensables, polisacáridos, β -caroteno y otros pigmentos (Blinkova y col., 2001).

2.3 Estudios basados en la medida del color

El color es una percepción que se genera en el cerebro al interpretar las señales nerviosas que le envían los fotorreceptores de la retina del ojo, que a su vez interpretan y distinguen las distintas longitudes de onda que son captadas de la parte visible del espectro electromagnético. Se puede decir que el color no existe por sí mismo, es una percepción relativa.

El fenómeno del color puede ser dividido en dos partes: la primera parte consiste en el fenómeno puramente físico y requiere tres elementos: una fuente de luz, un objeto y un detector. La interacción de la luz con el objeto puede dar lugar a fenómenos físicos como la refracción, la transmisión, la dispersión, etc. En la segunda parte ocurren una serie de procesos complicados y no del todo conocidos donde el receptor (el ojo) transmite información al cerebro que lo interpretará como color (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003).

Con lo cual, el color depende de la luz y consecuentemente de la fuente de la que procede. La luz está compuesta de diferentes longitudes de onda de radiación, y la luz visible es el componente más importante desde el punto de vista de la apreciación del color. La luz visible abarca una parte muy pequeña del espectro electromagnético, con radiaciones de longitudes de onda entre 380-750 nm ([Imagen 2.1](#)). Los colores percibidos por el ojo humano están asociados con la radiación de luz en el siguiente rango de valores: azul-violeta ($380 < \lambda < 480\text{nm}$), verde ($480 < \lambda < 560\text{nm}$), amarillo ($560 < \lambda < 590\text{nm}$), naranja ($590 < \lambda < 630\text{nm}$) y rojo ($630 < \lambda < 750\text{nm}$).

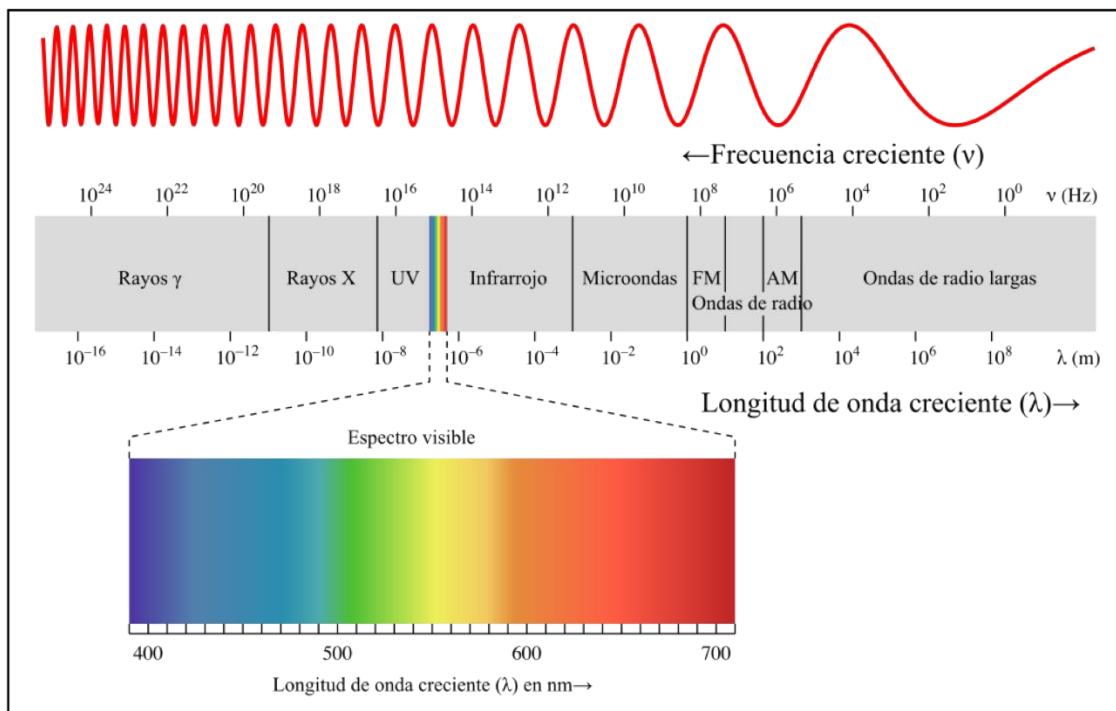


Imagen 2.1. Espectro electromagnético

2.3.1 Medida del color

Las tres principales cualidades del color de los objetos son las siguientes:

- **El tono.** Se identifica con el nombre del color, como por ejemplo rojo o amarillo.
- **El brillo.** Es un concepto relacionado con la luz y oscuridad, considerando al color como una fuente de luz reflejada. Con lo cual, se puede definir el brillo como la luz reflejada por una superficie en comparación a una superficie blanca bajo las mismas condiciones de iluminación.
- **La saturación.** Es un concepto relacionado con la claridad o pureza de un determinado color; a menor contenido de grises o blancos, más saturado estará dicho color. Además, también se puede definir como la intensidad del tono en comparación con su propio brillo. Un color saturado parece claro y brillante, mientras que un color insaturado parece pálido. El tono y la saturación son los principales atributos de la cromaticidad.

La evaluación del color según la percepción visual es una medida algo subjetiva, ya que depende de quien la realice. Las aplicaciones prácticas de la medida del color requieren medidas reproducibles, para las que existen numerosas técnicas colorimétricas, entre las que principalmente destacan tres: la primera consiste en una serie de sistemas visuales en la que el objeto de estudio se compara con unos estándares visuales; la

segunda técnica es un sistema físico en el cual se obtiene un espectro de reflexión o transmisión y se usa directamente o se convierte a un sistema triestímulo; y la tercera técnica consiste en un sistema de colorimetría triestímulo en el que las señales de una muestra por reflexión o transmisión se calculan directamente en unidades referidas a cómo ve el color el ojo humano (Francis, 1995).

La colorimetría es la medida del color utilizando instrumentos fotoeléctricos usando tres (o cuatro) luces coloreadas. Por otro lado, los métodos espectroscópicos utilizan luces monocromáticas para iluminar el objeto, midiendo la reflectancia espectral del objeto a cada longitud de onda del espectro visible. El conjunto de valores medidos forma la curva de reflectancia del objeto a medir, donde dicha curva posee toda la información necesaria para calcular el color de la muestra para cualquier fuente y cualquier observador, y para generar números que describan el color, como por ejemplo las coordenadas de color.

Actualmente, la evaluación instrumental del color está basada en la generalización tricomática, que implica que cualquier color puede obtenerse por la combinación de tres colores primarios, que son aquellos que no pueden conseguirse por la mezcla o adición de otros.

2.3.1.1 Condiciones que afectan a la medición del color

Tabla 2.2. Condiciones que afectan a la medida del color

CONDICIONES QUE AFECTAN AL COLOR	
Diferencias de fuente de luz	Cada tipo de iluminación hace que el mismo producto parezca diferente en relación con el color. Por ejemplo: luz solar, luz fluorescente, luz de tungsteno, etc.
Diferencias de fondo	Si se coloca un producto delante de un fondo claro parecerá más apagado que cuando se sitúa delante de un fondo oscuro. A esto se le llama efecto de contraste y no es deseable para un juicio preciso del color.
Diferencias direccionales	Cuando se observa un objeto, la visión de éste desde un ángulo ligeramente diferente puede hacer que parezca más claro o más oscuro. Esto es debido a las características direccionales de la pintura del mismo. Algunos materiales de coloración como pinturas metalizadas tienen características altamente direccionales. El ángulo de visualización del objeto (y también el ángulo de iluminación) deberán ser constantes para una comunicación precisa del color.

Diferencias del observador	La sensibilidad de los ojos de cada persona es ligeramente diferente, incluso en personas consideradas con una visión “normal” de los colores puede existir cierta polarización hacia el rojo o el azul. Asimismo, la vista de una persona cambia generalmente con la edad. Debido a estos factores, los colores pueden parecer distintos a los diferentes observadores.
Diferencias de tamaño	Los colores que cubren una zona grande tienden a parecer más claros y vivos que los colores que cubren una zona pequeña. Esto se conoce como efecto área. La selección de objetos para zonas grandes basándose en muestras de color pequeñas, puede acabar en errores.

2.3.2 Expresión numérica del color

La organización internacional de la luz y el color, la Comisión Internacional de la Iluminación (Commission Internationale de l'Eclairage – CIE) desarrolló sistemas para expresar el color de forma numérica. El sistema $L^*a^*b^*$, creado en 1975, proporciona diferencias de color más uniformes en relación con las diferencias visuales, y es el utilizado en este trabajo para definir los colores de las bebidas tónicas usadas como referencia y sus diferencias con las muestras elaboradas a partir del colorante natural B-ficoeritrina obtenido de la microalga *Porphyridum cruentum*.

2.3.2.1 Espacio del color $L^*a^*b^*$

El espacio de color $L^*a^*b^*$ (también llamado CIELAB) es actualmente uno de los espacios más populares para medir el color de los objetos y se utiliza ampliamente en casi todos los campos. El espacio de color CIELAB es una transformación matemática del espacio XYZ en el cual se fija un blanco de referencia y cuyos valores de triestímulo son (X_n , Y_n , Z_n). Ese blanco de referencia puede ser por ejemplo una fuente luminosa, el iluminante al que se haya adaptado el observador, un difusor perfecto o el color neutro más reflectante o transmisor de un medio de reproducción. En el sistema CIELAB, los colores deben verse sobre un fondo que vaya de blanco a gris medio por un observador adaptado a un iluminante que no sea demasiado distinto a la luz natural del mediodía.

Los tres ejes del sistema CIELAB se indican con los nombres L^* , a^* y b^* , que representan respectivamente la luminosidad, la tonalidad de rojo a verde y la tonalidad de amarillo a azul. Los asteriscos sirven para distinguir el espacio de color CIELAB de otros con nombres similares.

En la [Imagen 2.2](#), se muestra el espacio de color CIELAB. Los colores que están en el eje L^* , con las coordenadas a^* y b^* iguales a cero, son acromáticos (blanco, negro y grises), y van de 0 (negro) a 100 (blanco).

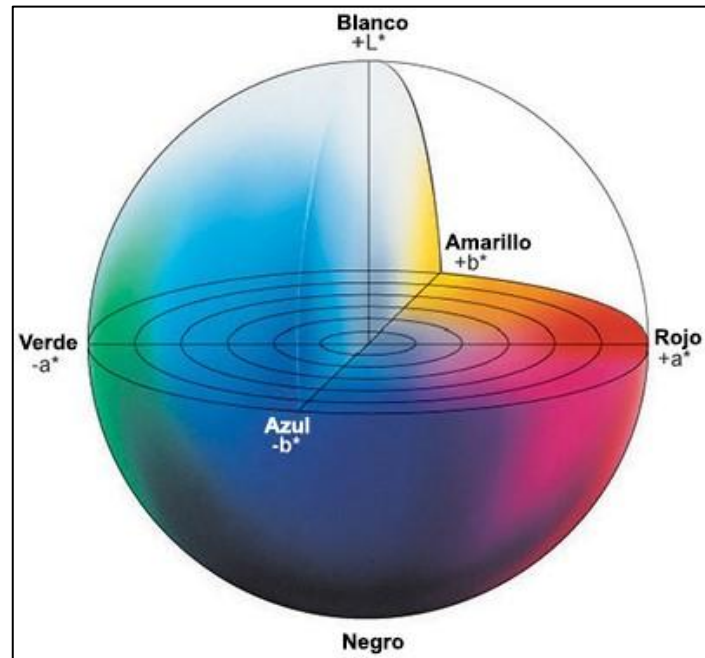


Imagen 2.2. Espacio de color CIELAB con las coordenadas L^* , a^* y b^*

En la [Imagen 2.3](#) se observa el diagrama de cromaticidad de a^* y b^* , correspondiente con una vista de la esfera de la Imagen 2.2 en sección horizontal en un valor constante de L^* . En este diagrama, a^* y b^* indican direcciones de colores: $+a^*$ es la dirección del rojo, $-a^*$ es la dirección del verde, $+b^*$ es la dirección del amarillo y $-b^*$ es la dirección del azul (Konica Minolta, 2007).

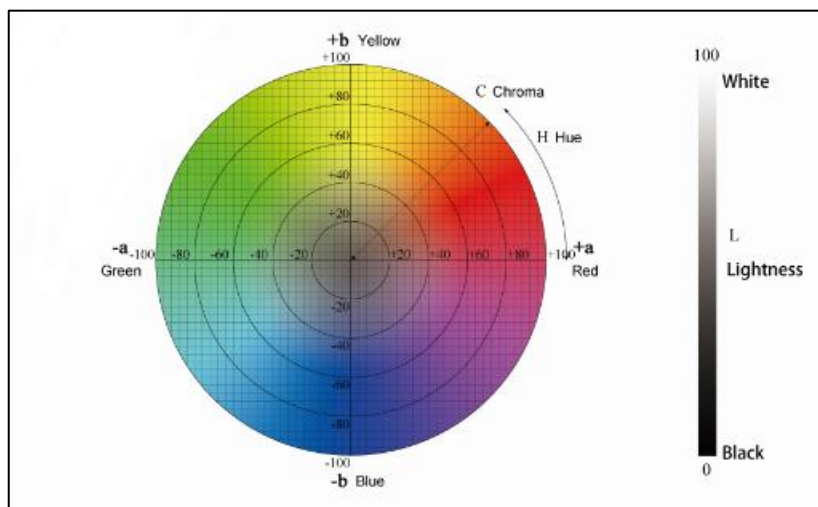


Imagen 2.3 Espacio de color CIELAB con coordenadas a^* y b^* , con L^* constante

2.3.3 Medida de la diferencia del color

El principal problema en cualquier lugar donde se use como herramienta el color, lo constituyen los pequeños matices de éste. Sin embargo, estas diminutas diferencias de color pueden expresarse numéricamente y comprenderse fácilmente mediante la utilización de un colorímetro.

En el espacio de color $L^*a^*b^*$, las diferencias de color pueden ser expresadas con un único valor ΔE^*_{ab} (Imagen 2.4). Este parámetro indica el valor de la diferencia, pero no en qué sentido se produce. ΔE^*_{ab} se define con la Ecuación (2.1) (Konica Minolta, 2007) mostrada a continuación:

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Ecuación (2.1)}$$

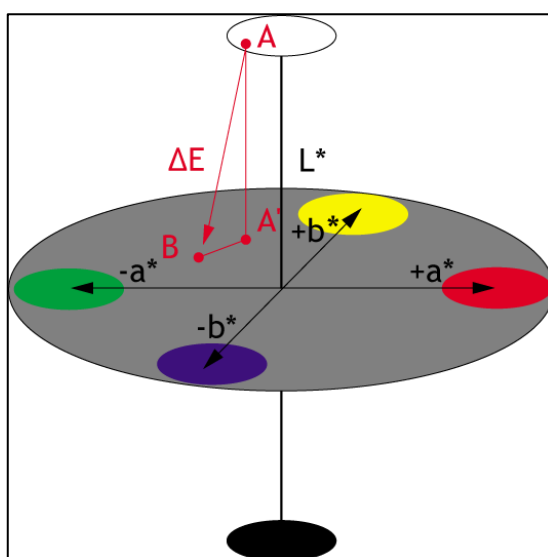


Imagen 2.4. Diferencias de color en el espacio $L^*a^*b^*$

A pesar de no ser tan exactas como los números, se pueden utilizar palabras para expresar diferencias de color como muestra la Imagen 2.5. Los términos mostrados en esta imagen indican la dirección de la diferencia de color, pero a menos que se emplee un modificador adicional (ligeramente, muy, etc.), no indican el grado de diferencia de color (Konica Minolta, 2007).

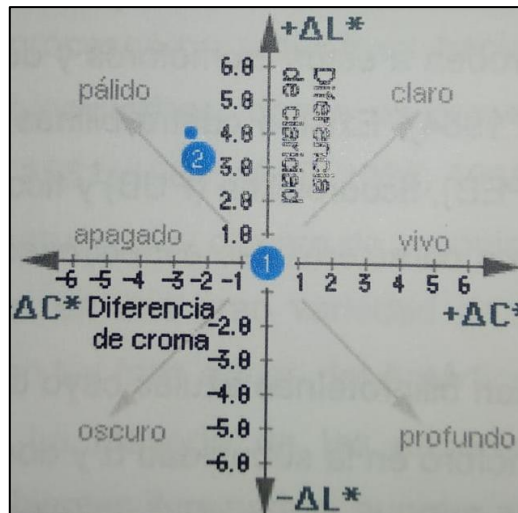


Imagen 2.5. Términos para describir diferencias de color en claridad y saturación

2.4 Las biliproteínas como colorantes

2.4.1 Generalidades

Las biliproteínas son una familia de proteínas homólogas solubles en agua, que están compuestas por subunidades del tipo α y β que conjuntamente forman monómeros. Dichos monómeros se enlazan pudiendo formar agregaciones como trímeros o hexámeros. El estado de agregación de la biliproteína depende de la fuerza iónica, del PH (Scott y Berns, 1965; MacColl y col., 1971), de la temperatura (Scott y Berns, 1965), de la presencia de agentes desnaturizantes (Berns y Scott, 1966; Berns y Morgenstern, 1968) y de la composición del tampón y concentración de la proteína (Saxena, 1988).

Estas macromoléculas se caracterizan por poseer grupos prostéticos tetrapirrólicos de cadena abierta llamados bilinas, enlazados covalentemente a los residuos de cisteína a través de los enlaces tioéter. Ese nombre lo reciben debido a que su estructura cerrada es muy parecida a la de la bilirrubina y biliverdina, que son pigmentos biliares humanos conocidos (Lemberg y Legge, 1949).

Los grupos cromóforos les otorgan altos coeficientes de extinción en una zona amplia del espectro electromagnético que, junto a su alto rendimiento cuántico, proporciona magníficas propiedades fluorescentes. Las propiedades espectroscópicas de las biliproteínas dependen de la estructura y del número de bilinas que contienen, del ambiente proteico que rodea a estos cromóforos y de las relaciones estéricas entre ellos (Scheer, 1981; Glazer, 1984). Existen cuatro bilinas isoméricas que son: ficocianobilina (PCB), ficoeritrobilina (PEB), ficourobilina (PUB) y ficobiliviolina (PXB).

En función de sus características espectroscópicas, las biliproteínas se clasifican en tres grupos:

- **Ficocianinas.** Son biliproteínas azules en las que el grupo cromóforo es la ficocianobilina (PCB). Poseen un cromóforo en la subunidad α y dos en la subunidad β . La R-ficocianina es una ficocianina especial que además de PCB posee PEB (ficoeritrobilina).
- **Aloficocianinas.** Son biliproteínas azules en las que el grupo cromóforo lo constituyen la ficoeritrobilina (PEB) y la ficourobilina (PUB). Poseen dos o tres bilinas en la subunidad α y tres en la subunidad β .
- **Ficoeritrinas.** Son biliproteínas rojas en las que el grupo cromóforo lo constituyen la ficoeritrobilina (PEB) y la ficourobilina (PUB). Poseen dos o tres bilinas en la subunidad α y tres en la subunidad β .

Solo unas pocas especies de cianobacterias (descritas posteriormente), poseen un cuarto grupo de biliproteínas denominadas ficoeritrocianinas cuyos cromóforos son PCB y ficobiliviolina (PXB). En la [Tabla 2.3](#) se muestran los máximos de absorción y de emisión de las biliproteínas.

Tabla 2.3. Máximos de absorción y de emisión de biliproteínas

Biliproteína	Absorción $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	Emisión $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
C-ficocianina (C-PC)	615-620	630-642
Aloficocianina (APC)	650 (hombro a 620)	660
R-ficocianina (R-CP)	618, 555	642
B-ficoeritrina (B-PE)	498, 543, 562	576
C-ficoeritrina (CPE)	565	575-581
R-ficoeritrina (RPE)	495, 536, 564	576

Las biliproteínas se encuentran en las cianobacterias (comúnmente llamadas algas verde-azuladas) (Stainer y col., 1971; Rippka y col., 1979), en los cloroplastos de las rodofitas (algas rojas) (Glazer y col., 1982; Honsell y col., 1984; Mörschel y Rhiel, 1987) y en especies pertenecientes a las algas criptomonadales (criptofíceas), una clase de algas eucariotas unicelulares y biflageladas (Allen y col., 1959; Haxo y Fork, 1959; Gantt, 1979; Glazer y Wedemayer, 1995; Wedemayer y col., 1996). En todos estos organismos, la función de las biliproteínas es la de actuar como accesorio fotosintético. Absorben luz en un amplio rango de longitud de onda del espectro visible y transfieren la energía de excitación mediante procesos no radiactivos hacia los centros de reacción, localizados en

las membranas fotosintéticas donde es convertida en energía química (Gantt, 1979; 1980; Glazer, 1976, 1981; 1984; 1985; 1986; 1989).

Las cianobacterias son un grupo muy diverso de organismos procariotas (Rippka y col., 1979; Rippka, 1988). Crecen en diversos hábitats como áridos desiertos, lagos de aguas frías, en aguas salinas, en aguas frías del Antártico, en el océano abierto, en tierra y en superficies rocosas. Gran parte de las especies de cianobacterias son fototrópicas, que quiere decir que están limitadas a ambientes iluminados, aunque en algunos de sus hábitats como cavernas, los niveles de luz son muy bajos (Fogg y col., 1973). Las cianobacterias pueden crecer con facilidad en cultivos masivos hasta densidades de bastantes gramos por litro (peso húmedo), siempre que se suministre por agitación (o circulación) en el cultivo la adecuada iluminación y el apropiado aporte de dióxido de carbono. Las mayores cantidades de biliproteínas se encuentran en organismos cultivados con luz blanca de baja intensidad (Myers y Kratz, 1955).

Las algas rojas son un grupo muy diverso con más de 400 géneros y 4000 especies. Morfológicamente conforman un amplio grupo, desde organismos unicelulares hasta plantas superiores. Son predominantemente organismos marinos y se localizan tanto en aguas tropicales como en aguas frías (Cole y Sneath, 1990). Las algas rojas unicelulares tales como *Porphyridium cruentum* (Lee y Bazin, 1990; Dermoun y col., 1992; Chaumont, 1993) o *Rhodella reticulata* (Mihova y col., 1996), pueden crecer con facilidad como cultivos puros, en grandes cantidades en el laboratorio. Algunas algas rojas multicelulares pueden también mantenerse en cultivo puro en el laboratorio. Sin embargo, de manera general crecen muy despacio y su destino es la utilización en trabajos bioquímicos.

Las algas criptomonadales se encuentran tanto en aguas marinas como en aguas frías continentales (Gantt, 1979). Muchas especies están disponibles en cultivos puros y pueden desarrollarse fácilmente en gran escala.

Las biliproteínas dentro de las células de cianobacterias y de los cloroplastos de algas rojas, forman agregados moleculares llamados ficobilisomas. Los ficobilisomas son de forma esférica y de 600 nm de diámetro aproximadamente, y de masa en torno a los 2500 KDa. Se encuentran unidos a la cara externa de la membrana tilacoidal y actúan como pigmentos antena que absorben la luz y canalizan la energía de excitación. Constituidos exclusivamente de biliproteínas y polipéptidos enlazantes. Las biliproteínas constituyen el 85% de la masa del ficobilisoma y se organizan en orden a su máxima absorción: ficoeritrinas en la periferia, ficocianinas en el centro y aloficocianinas muy cerca de los centros de reacción en la membrana tilacoidal (Gantt, 1980). La ruta de la transferencia de energía dentro de la célula es la siguiente:

Ficoeritrina → Ficocianina → Aloficocianina → Clorofila

En los ficobilisomas intactos, las biliproteínas no fluorescen ya que su energía de excitación es transferida con gran eficacia al centro de reacción. Sin embargo, las biliproteínas fluorescen con intensidad en ausencia del captador de energía.

El valor como reactivo de una determinada biliproteína, ya sea como marcador fluorescente en análisis celular, en inmunoensayo o en histoquímica depende, ante todo, de:

- A. Composición de las subunidades
- B. Composición y contenido de bilinas
- C. Estado de oligomerización
- D. Monodispersidad del oligómero
- E. Espectro de absorción en el visible y coeficientes de extinción en los máximos
- F. Rendimiento cuántico de fluorescencia

2.4.2 Aplicaciones

2.4.2.1 Colorantes naturales

Actualmente, por parte de los consumidores existe una demanda de reemplazar los colorantes sintéticos por compuestos de origen natural, a la que los sectores industriales afectados deben dar respuesta (Bermejo, 2008; 2009). Esto ocurre debido a la existencia de numerosos estudios que indican que los colorantes sintéticos son extremadamente tóxicos e incluso cancerígenos, generando reacciones alérgicas en individuos susceptibles. Sin embargo, esto no ocurre cuando se utilizan compuestos naturales obtenidos a partir de organismos vivos, denominados biocolorantes. No obstante, el número de colorantes naturales y su gama de colores son escasos en relación con las necesidades reales existentes en el mercado, por lo que la utilización de compuestos sintéticos sigue siendo mayoritaria. Por ejemplo, la industria del sector lácteo utiliza actualmente un gran número de colorantes sintéticos, tanto en productos frescos (postres, leches fermentadas, queso, etc.), como en productos de larga vida (leches aromatizadas, postres esterilizados, etc.). La utilización de colorantes de tipo natural es muy limitada, pues además de escasos, la mayoría son poco estables frente a las condiciones de tratamiento térmico y conservación, producen sabores anómalos y algunos presentan problemas de solubilidad.

En este sentido, las biliproteínas poseen diferentes colores muy intensos y atractivos que hacen que estas macromoléculas posean un elevado potencial de utilización como colorantes naturales en amplios sectores, reemplazando así a los tradicionales colorantes sintéticos. Las biliproteínas más abundantes en la naturaleza son las ficoeritrinas y las ficocianinas. Las ficoeritrinas poseen tonalidades rosas, rojas y

anaranjadas, mientras que las ficocianinas poseen colores de la gama de los azules y morados. Por tanto, la gama y la intensidad de colores disponibles, así como la abundancia relativa de estas proteínas en los organismos de procedencia, hacen de estas macromoléculas excelentes candidatos para su empleo como colorantes, constituyendo una alternativa real para el aumento y diversificación de la oferta de colorantes naturales existentes en el mercado.

Hoy en día, las reglamentaciones que existe sobre el uso de colorantes sintéticos en productos alimenticios son muy estrictas, fomentándose la puesta en marcha de programas de producción de colorantes de origen natural. Estas investigaciones han dado pie al aumento de registros sobre patentes de colorantes naturales frente a colorantes sintéticos. Grandes compañías, como Eastman Kodak y Hoffmann La Roche están implicadas activamente en este campo (Klausner, 1986; Parkinson, 1987; Guerrero y Losada, 1989).

En Japón, donde la industria del cultivo de microalgas se encuentra muy desarrollada, se ha patentado el uso de biliproteínas como colorantes alimenticios en productos lácteos fermentados como el yogur (Dainnison, 1979). De igual manera, ficocianinas procedentes de algas verdes azuladas son utilizadas en productos cosméticos y en golosinas (Dainnison, 1987; Arad y Yaron, 1992; Spolaore y col., 2006).

Las biliproteínas son extremadamente solubles en agua, pero algunas de las anteriores aplicaciones como colorante requieren su solubilización en medios apolares. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha comenzado estudiando la inclusión de biliproteínas tales como C-ficocianina y B-ficoeritrina en los núcleos acuosos de microemulsiones formadas por AOT/agua/isooctano, como un sistema previo a su inclusión en medios apolares como los existentes en productos lácteos (Bermejo y col., 2000; 2003).

2.4.2.2 Marcadores fluorescentes

Una de las aplicaciones de las biliproteínas es la utilización como marcadores fluorescentes, adquiriendo ventaja sobre uno de los colorantes más utilizados como marcador en bioquímica y biología, la fluoresceína. En efecto, la fluoresceína presenta algunos inconvenientes tales como la disminución de la solubilidad en agua de las proteínas a las que etiqueta y el aumento de la tendencia de éstas a unirse de forma inespecífica a otras sustancias. Además, el tipo de emisión verde característico de la fluoresceína es producida también por algunas sustancias naturales presentes en los fluidos y tejidos biológicos, lo que provoca la consiguiente falta de especificidad en la señal fluorescente.

Las biliproteínas pueden ser catalogadas como inmejorables marcadores fluorescentes útiles en diferentes técnicas de estudio diagnóstico e investigación, ya que presentan múltiples ventajas respecto a los marcadores fluorescentes tradicionales:

- Fluorescen con un alto rendimiento cuántico
- Su emisión no se altera prácticamente en márgenes amplios de temperatura y de pH
- Son muy solubles en agua
- Debido a su estabilidad se pueden almacenar durante meses
- La fluorescencia anaranjada que producen es fácil de diferenciar de la fluorescencia verde producida por sustancias naturales

(Kronick y Grossman, 1983; Glazer y Stryer, 1984; MacColl y Guar-Friar, 1987; Zola y col., 1992; Aráoz y col., 1998; Batard y col., 2002; Bermejo y col., 2002; Sun y col., 2003). Debido a todo esto, nuestro grupo de investigación ha estudiado la utilización de biliproteínas (C-PC, APC y B-PE) como etiquetas fluorescentes de ácidos nucleicos para la detección de la hibridación de éstos en medios homogéneos mediante espectroscopía de fluorescencia (Bermejo y col., 2002).

2.4.2.3 Otras aplicaciones

Se han desarrollado estudios clínicos dirigidos a comprobar la eficiencia de las biliproteínas en el tratamiento de distintas formas de cáncer. Estas macromoléculas han mostrado poseer valor terapéutico debido a su efecto protector y su actividad anticarcinogénica (Koho, 1982; González y col., 1999; Huang y col., 2002). Particularmente, las ficocianinas poseen propiedades muy beneficiosas desde el punto de vista médico y farmacológico, habiendo sido ensayadas en diferentes estudios que demuestran su capacidad anticarcinogénica (Remirez y col., 1999), actividad antioxidante y antiinflamatoria (Benedetti y col., 2006; Bhat y Madyastha, 2000). Asimismo, se ha demostrado que la ficocianina posee efectos positivos sobre el sistema inmunitario. Así, experimentos de administración oral de extracto de ficocianina a ratones con cáncer de hígado demostraron que el índice de supervivencia del grupo de tratamiento fue significativamente más alto que el observado en el grupo de control no tratado con ficocianina, encontrándose además un incremento de la actividad linfocitaria.

Otros autores han estudiado los efectos positivos de ficocianinas como agente protector antioxidante de eritrocitos en humanos, frente a la ruptura provocada por radicales peroxi (Romay y González, 2000) y en animales como ratones (Romay y col., 1999). Actualmente, se está estudiando el efecto antioxidante y quelante sobre el hierro de

extractos de ficocianinas procedentes de la microalga *Spirulina platensis* (Bermejo y col., 2008).

Otro tipo de aplicación en continuo desarrollo en la actualidad es la utilización de biliproteínas como parte fundamental de biosensores. Así, la B-ficoeritrina se ha utilizado para la determinación de contaminación ambiental provocada por insecticidas organoclorados (Ayyagari y col., 1995).

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

- Potasio Dihidrógeno Fosfato (KH_2PO_4). Panreac.
- Sodio Hidrógeno Fosfato (Na_2HPO_4). Panreac.
- Azida sódica (NaN_3). Panreac.

El Potasio Dihidrógeno Fosfato junto con el Sodio Hidrógeno Fosfato se utilizan para la preparación de la disolución tampón o buffer a pH 7, necesaria para la obtención del medio donde se disolverá la muestra de microalga BPE. La Azida Sódica se añade tanto a las muestras extracto como a las muestras liofilizadas que se vayan preparando para los diferentes análisis, para mejorar así su conservación y que no se produzca deterioro de las disoluciones por proliferación de microorganismos.

3.1.2 Instrumentación

- ✓ Espectrofotómetro. Es un instrumento que sirve para medir la cantidad de intensidad de luz absorbida por una muestra después de atravesarla ([Imagen 3.1](#)). Nos proporciona los valores de absorbancia de las muestras analizadas y sus correspondientes espectros UV-Visible. El espectrofotómetro empleado es el *Perkin-Elmer* modelo *Lambda 20*. Entre las principales características que reúne dicho instrumento se encuentran un doble haz, posibilidad de hacer medidas de absorbancia, % de Transmitancia, derivadas primera, segunda, tercera y cuarta, rango de longitudes de onda entre 190-900 nm, rango de velocidad de exploración entre 7'5-480 nm/min con una precisión en la longitud de onda de 0'3 nm, rendijas desde 0'25 hasta 4 nm, tiempos de respuesta desde 0'2 segundos hasta 10 segundos. Se controla mediante un ordenador externo con un software llamado UV Data Manager. El sistema óptico de dicho espectrofotómetro consta de un premonocromador con una red holográfica cóncava (660 líneas/mm) y de un monocromador red-filtro en configuración Littrow con red holográfica (14440 líneas/mm). Para las medidas realizadas se emplearon cubetas/células de cuarzo con tapón de teflón de 0'2x1 cm (microcélula) y de 1x1 cm (célula normal), marca Hellma.



Imagen 3.1. Espectrofotómetro UV-visible

- ✓ Espectrocolorímetro. Es un instrumento que sirve para medir el color en las muestras deseadas ([Imagen 3.2](#)). El espectrocolorímetro empleado es el *Minolta CM-3500d*. Entre las principales características que reúne dicho instrumento se encuentran un rango de longitud de onda que abarca desde 400 nm hasta 700 nm y un rango fotométrico de 0 hasta 175% con una resolución de 0'01%. Como fuente de luz posee una lámpara de arco de xenón pulsada. La medida tiene una geometría de d/8 (reflectancia) y d/0 (transmitancia). La repetibilidad es del 0'2%SD para la reflectancia espectral y 0'05 para la cromaticidad. Además, el rango de temperatura y humedad de trabajo es de 0 a 40°C y menos del 85% de humedad. Se controla mediante un ordenador externo con un software llamado *SpectraMagic* 3.6.1.



Imagen 3.2. Espectrocolorímetro

- ✓ Espectrofluorímetro. Es un instrumento que sirve para medir la cantidad de intensidad de fluorescencia emitida por una muestra después de incidir sobre ella un haz de luz procedente de una fuente [\(Imagen 3.3\)](#). Nos proporciona los valores de fluorescencia de las muestras analizadas y sus correspondientes espectros de fluorescencia de estado estacionario. El espectrofluorímetro empleado es el JASCO FP-6500. Entre las principales características que reúne dicho instrumento se encuentran que posee un doble monocromador para excitación y para emisión, una lámpara xenón (150 W), un rango de medición de 200-750 nm Ex/Em, rendijas de anchuras variables de 1, 3, 5, 10 y 20 nm, una velocidad de barrido comprendida entre 10-20000 nm/min y una respuesta comprendida entre 0,01-8 segundos. Se controla mediante un ordenador externo con un software llamado Spectramanager. Para las medidas realizadas se emplearon cubetas/células de cuarzo para fluorescencia con tapón de teflón, de 0'2x1 cm (microcélula) y de 1x1 cm (célula normal), marca Hellma. Una vez introducida la muestra en el equipo se ajustan parámetros como λ_{ex} , λ_{em} , sensibilidad de la medida y longitud de onda donde nuestra molécula absorba más, para que así la señal de fluorescencia sea lo más intensa y limpia posible.



Imagen 3.3. Espectrofluorímetro

- ✓ Agitadores. Para la agitación de disoluciones contenidas en vasos de precipitados se ha utilizado un agitador magnético JP7000243 con velocidad regulable de 60 a 1600 r.p.m. y de volumen máximo agitable hasta 10 litros. Y para la agitación de tubos de ensayo se ha utilizado un agitador Vortex con velocidad regulable.

- ✓ Instrumento para la medida del pH. Para las medidas de pH se ha usado un instrumento con modelo Crison digilab 517, con un electrodo fino para medir microvolúmenes de muestra ([Imagen 3.4](#)). Para llevar a cabo la calibración del instrumento se usan tampones de referencia a pH 9, 7 y 4'01, introducidos en el orden que te los solicita dicho instrumento.



Imagen 3.4. Instrumento para la medida del pH

- ✓ Balanza analítica. Una balanza analítica electrónica COBOS modelo A-100-CS, que consta de un sistema de calibración interno y externo. Posee una desviación estándar de la misma de ± 0.1 mg ([Imagen 3.5](#)).



Imagen 3.5. Balanza analítica

- ✓ Granatario. El instrumento utilizado es el modelo COBOS CB-Junior con pesada máxima de 150 mg y una precisión de $\pm 0'001$ g ([Imagen 3.6](#)).



Imagen 3.6. Granatario

3.1.3 *Material biológico*

3.1.3.1 *Microalga Porphyridium cruentum*

Se ha utilizado la microalga roja *Porphyridium cruentum* para la obtención de B-PE. Ésta ha sido cultivada en fotobiorreactores por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería y liofilizada para su transporte.



Imagen 3.7. Microalga roja *Porphyridium cruentum* liofilizada

3.1.3.2 B-PE liofilizada

El grupo de investigación FQM-337 Estructura y Dinámica de Sistemas químicos, ha puesto a punto una metodología para la obtención de B-PE pura en formato liofilizado (Bermejo y col., 2003). Esta proteína ha sido utilizada para los ensayos correspondientes de esta Memoria de TFG ([Imagen 3.8](#)).



Imagen 3.8. B-PE liofilizada

3.1.3.3 Muestras de bebidas tónicas

Para los ensayos de colorimetría, las muestras alimenticias utilizadas han sido bebidas tónicas de diferentes marcas.

En ellas, será importante conocer el tipo de colorante (generalmente sintético en las muestras escogidas para hacer la comparativa con nuestro colorante natural) que ha utilizado cada fabricante para llegar a conseguir el color deseado en sus respectivos productos alimenticios. A continuación, en la [Tabla 3.1](#), se detallan los diferentes colorantes contenidos en las muestras alimenticias elegidas para los ensayos de colorimetría con B-PE liofilizada.

Tabla 3.1. Colorantes de las muestras alimenticias de bebidas tónicas comerciales ensayadas con B-PE liofilizada obtenida a partir de la microalga roja *Porphyridium cruentum*

Tipo de muestra	Marca de muestra	Colorante de la muestra
Bebidas tónicas	Original Berries	<i>Rojo Allura AC (E129)</i>
	Schweppes Pink	<i>Antiocianinas (E163)</i>

Uno de los colorantes usados en bebidas tónicas es el Rojo Allura AC (E129), un colorante sintético cuyo uso está restringido en los productos cárnicos y en los de confitería. Su estructura química y su aspecto se muestran en la [Imagen 3.9](#).

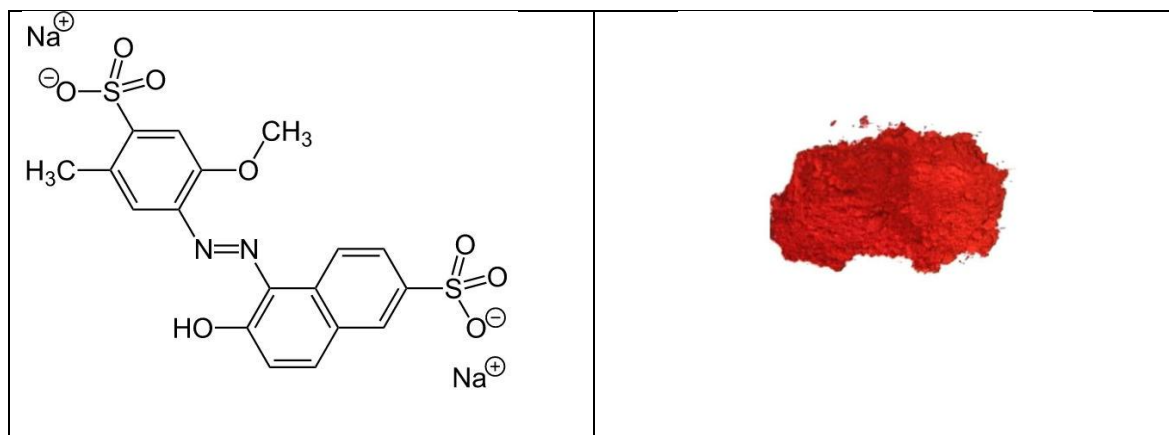


Imagen 3.9. Estructura química y aspecto visual del Rojo Allura AC (E129)

Otro de los colorantes usados en bebidas tónicas son las Antocianinas (E163), un colorante natural formado por un azúcar unido a la estructura química responsable del color. Son las responsables de muchos de los colores rojos, naranjas, azules y violetas en las plantas. Hay alrededor de 275 conocidas y forman parte del grupo de flavonoides. Son estables al calor y a la luz, pero sensibles al pH. Se utilizan relativamente poco, en algunos derivados lácteos, helados, caramelo, productos de pastelería y conservas vegetales. Su estructura química y su aspecto se muestra en la [Imagen 3.10](#).

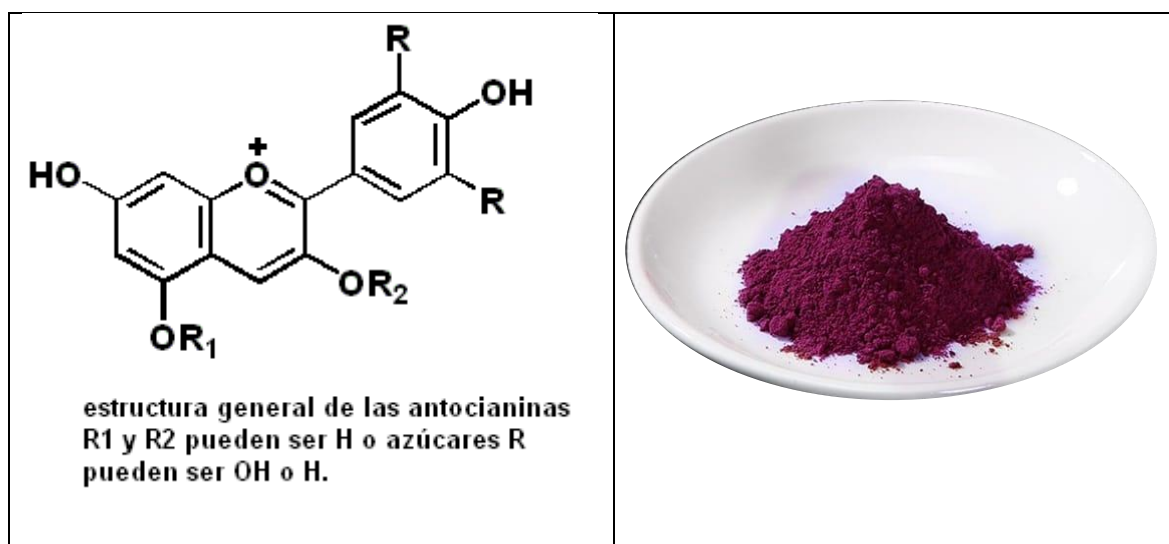


Imagen 3.10. Estructura química y aspecto visual de las Antocianinas (E163)

3.2 Métodos

3.2.1 Adición a las matrices alimentarias del colorante liofilizado

Las matrices alimentarias utilizadas en esta Memoria han sido bebidas tónicas de dos marcas diferentes. Para cada marca de tónica se han preparado dos muestras, una de ellas con la bebida tónica coloreada que servirá como patrón, y otra de ellas formada por la bebida tónica de la misma marca, pero incolora, adicionada con la disolución de colorante B-PE liofilizada generada para reproducir el color de la muestra patrón. Para llevar a cabo las medidas del color en las muestras mencionadas, se utilizan unas cubetas transparentes de plástico rígido con unas dimensiones de 4,2 x 3,2 x 1,0 cm.

La cubeta con la muestra de bebida tónica coloreada sólo se utilizará una única vez por experimento, constituyendo así el patrón de referencia del equipo (colorímetro), a partir del cual se irá comparando medida a medida el cambio progresivo del color de la muestra contenida en la otra cubeta (bebida tónica incolora).

Antes de proceder a la adición de colorante, al tratarse las bebidas tónicas de muestras gaseosas, éstas deben ser desgasificadas para evitar la interferencia de los gases en la medida del color. La desgasificación consiste en la agitación de la muestra mediante un agitador magnético durante unos minutos hasta que comprobemos visualmente que no existen burbujas de gas en nuestra muestra.

La adición de la disolución de colorante B-PE liofilizada sobre la muestra de la cubeta con la bebida tónica incolora, se realiza de manera progresiva, mediante la utilización de micropipetas y con cantidades suficientes para medir cambios apreciables de color.

Tras la adición se realiza la homogenización de la muestra en la cubeta, tapándola para evitar la pérdida de muestra y agitándola posteriormente varias veces hasta total homogeneización. En la [Tabla 3.2](#) aparecen detalladas las muestras de bebidas tónicas ensayadas, así como la muestra utilizada como blanco, al que se le ha ido añadiendo la disolución de colorante B-PE liofilizada.

Tabla 3.2. Muestras ensayadas con el colorante B-PE liofilizada obtenida a partir de la microalga *Porphyridium cruentum*

Colorante utilizado	Tipo de muestra	Muestra Patrón	Blanco
B-PE [1,77 mg/mL]	Bebida tónica Original	Original Pink	Original Yuzu
	Bebida tónica Schweppes	Schweppes Pink	Schweppes

Se ha ensayado un método para ir generando disoluciones tónicas que, partiendo inicialmente del blanco, fueran aproximándose al color de la bebida comercial por adición del colorante natural B-PE liofilizada.

De esta forma se ha procedido a realizar un proceso de adición de colorante natural B-PE liofilizada con el doble objetivo de: primero llegar a un color lo más cercano posible al de la bebida comercial; y segundo: alcanzar un color que, sin ser el comercial, resulte atractivo desde el punto de vista del consumidor y aunque precise mayor cantidad de colorante natural.

3.2.2 Cálculo de los factores de tinción

Una vez realizados los ensayos de colorimetría, se suele calcular el factor de tinción de cada muestra. El factor de tinción es la cantidad en miligramos de colorante natural (biliproteína) que son necesarios añadir por unidad de volumen de muestra (generalmente expresado en litros), para alcanzar el color deseado (bien uno muy parecido a la muestra comercial o bien uno atractivo, aunque precise mayor cantidad de colorante).

Este factor de tinción nos da la información necesaria para poder realizar comparativas entre unas marcas comerciales y otras, en cuanto a las cantidades de colorante natural a añadir para alcanzar las tonalidades que se persiguen.

El cálculo del factor de tinción se lleva a cabo con la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}
 \text{Factor de tinción } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) &= \frac{\text{Cantidad de colorante añadido (mg)}}{\text{Volumen total (mL)}} \\
 &= \frac{\text{Volumen de colorante (mL)} \cdot \text{Concentración del colorante } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}{\text{Volumen de muestra (mL)} + \text{Volumen de colorante (mL)}}
 \end{aligned}
 \quad \text{Ecuación (3.1)}$$

En todos los ensayos el volumen de muestra será de 14 mL, ya que se corresponde con la capacidad de las cubetas que se usan en el colorímetro. El volumen de colorante será el volumen que hemos gastado de colorante B-PE liofilizada para llegar al color deseado, y la concentración del colorante B-PE liofilizada utilizado ha sido de 1,77 mg/mL, valor que se obtiene mediante las Ecuaciones (3.2), (3.3) y (3.4) (Bermejo y col., 2002).

3.2.3 Técnicas espectroscópicas de caracterización físicoquímica

3.2.3.1 Espectroscopía de absorción UV-visible

Mediante el espectrofotómetro obtenemos los espectros de UV-visible de las muestras, y a partir de ellos, su concentración en biliproteínas. El modelo usado es el descrito en el apartado 3.1.2. Instrumentación. Dichos espectros se realizaron en el intervalo de 250-700 nm, utilizando una velocidad de 240 nm/min. Ya que trabajamos en la región ultravioleta, las cubetas de absorción utilizadas son de cuarzo de 4 mL de capacidad.

A continuación, se detallan las diferentes ecuaciones utilizadas y que han permitido realizar el cálculo de las concentraciones de las biliproteínas obtenidas a partir de determinados valores de absorbancia para longitudes de onda concretas.

En el caso de nuestro colorante natural rosa obtenido a partir del alga *Porphyridium cruentum*, su concentración será expresada en mg B-PE/mL (que corresponde al compuesto mayoritario). Se han utilizado las Ecuaciones (3.2), (3.3) y (3.4) (Bermejo y col., 2002) mostradas a continuación.

$$[B - PE] \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{(A_{565\text{ nm}} - 2,8 \cdot [R - CP] - 1,34 \cdot [APC])}{12,7} \quad \text{Ecuación (3.2)}$$

$$[R - CP] \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{(A_{620\text{ nm}} - 0,7 \cdot A_{650\text{ nm}})}{7,38} \quad \text{Ecuación (3.3)}$$

$$[APC] \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{(A_{650\text{ nm}} - 0,19 \cdot A_{620\text{ nm}})}{5,65} \quad \text{Ecuación (3.4)}$$

Debemos de tener en cuenta el color intenso de la disolución colorante natural rosa B-PE, por lo que será conveniente realizar una dilución del mismo para que la medida de la absorbancia se encuentre por debajo de 1 (zona de mínimo error espectrofotométrico).

Dicha dilución se lleva a cabo con una disolución tampón de pH 7 y fuerza iónica 5mM, generada a partir de los reactivos Potasio Dihidrógeno Fosfato (KH_2PO_4), que proporcionará a la disolución carácter ácido, y Sodio Hidrógeno Fosfato (Na_2HPO_4), que proporcionará a la disolución carácter básico. En la cubeta que utilicemos como blanco, también estará llena de esta disolución tampón.

El factor de dilución aplicado al finalizar la medida y el cálculo de B-PE (mg/mL) será el que se indica en la [Ecuación \(3.5\)](#):

$$\begin{aligned} \text{Factor de dilución} &= \frac{\text{Volumen total (mL)}}{\text{Volumen colorante (mL)}} \\ &= \frac{\text{Volumen colorante (mL)} + \text{Volumen disolución tampón (mL)}}{\text{Volumen colorante (mL)}} \end{aligned} \quad \text{Ecuación (3.5)}$$

De manera que, la concentración real de B-PE será el resultado de multiplicar la concentración obtenida según la [Ecuación \(3.2\)](#) por el factor de dilución correspondiente.

3.2.3.2 Espectrocolorimetría

Mediante el espectrocolorímetro se ha procedido a realizar la determinación del color de las muestras. Dicho equipo proporciona medidas en el espacio de color del sistema CIELAB. Antes de utilizar el equipo, éste se debe de calibrar con un material opaco en su totalidad (0% de transmitancia) y con una cubeta (de iguales características que las que usaremos para realizar las mediciones) llena de agua destilada (100% de transmitancia). Las cubetas tienen una capacidad de 14 mL. Una vez calibrado, se procede a realizar las mediciones de las muestras para determinar los distintos parámetros de color que poseen. Para ello se mide el valor de los parámetros colorimétricos de cada muestra (L^* , a^* , b^*), así como la variación del ΔE^*_{ab} obtenido por comparación con el patrón correspondiente a cada muestra y obtenida según la [Ecuación \(2.1\)](#) (Konica Minolta, 2007).

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Ecuación (2.1)}$$

3.2.3.3 Espectrofluorimetría

Mediante el espectrofluorímetro obtenemos los espectros de fluorescencia de las muestras, trabajamos a temperatura ambiente y medimos fluorescencia en estado estacionario. Los espectros representan la intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda de cada muestra. El equipo usado es el descrito en el apartado 3.1.2. Instrumentación. Dichos espectros se realizaron en el intervalo de longitudes de onda 595-700 nm, utilizando una velocidad de 200 nm/min. El modo de medida ha sido modo emisión. El tiempo de respuesta de 2 segundos. Las cubetas de fluorescencia utilizadas son de cuarzo de 4 mL de capacidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de B-ficoeritrina (B-PE) liofilizada

Primeramente, se realizó la preparación de una disolución B-PE liofilizada de concentración 1,77 mg/mL. El medio de disolución es tampón Fosfato 5 mM preparado a partir de la disolución madre con cantidades mostradas en la [Tabla 4.1](#). Para una completa disolución, agitamos el tubo en un agitador tipo vórtex o mezclador de vórtice, hasta su completa disolución.

Tabla 4.1. Disolución tampón madre de Fosfato. Medio utilizado para la disolución de B-ficoeritrina (B-PE) procedente de *Porphyridium cruentum*

Disolución tampón	pH	Fuerza iónica (M)	Cantidad KH_2PO_4 (g/L)	Cantidad Na_2HPO_4 (g/L)
Fosfato	7	0,1	61,6	5,6

A continuación, preparamos una dilución de este tubo, de 75 μL de disolución B-PE liofilizada (1,77 mg/mL) en 3925 μL de disolución tampón Fosfato 5 mM. Con lo cual, el factor de dilución obtenido fue de 53,3 aplicando la [Ecuación \(3.5\)](#). Esta dilución es llevada al espectrofotómetro UV-visible para obtener su espectro ([Figura 4.1](#)) y poder calcular así la concentración de B-PE liofilizada.

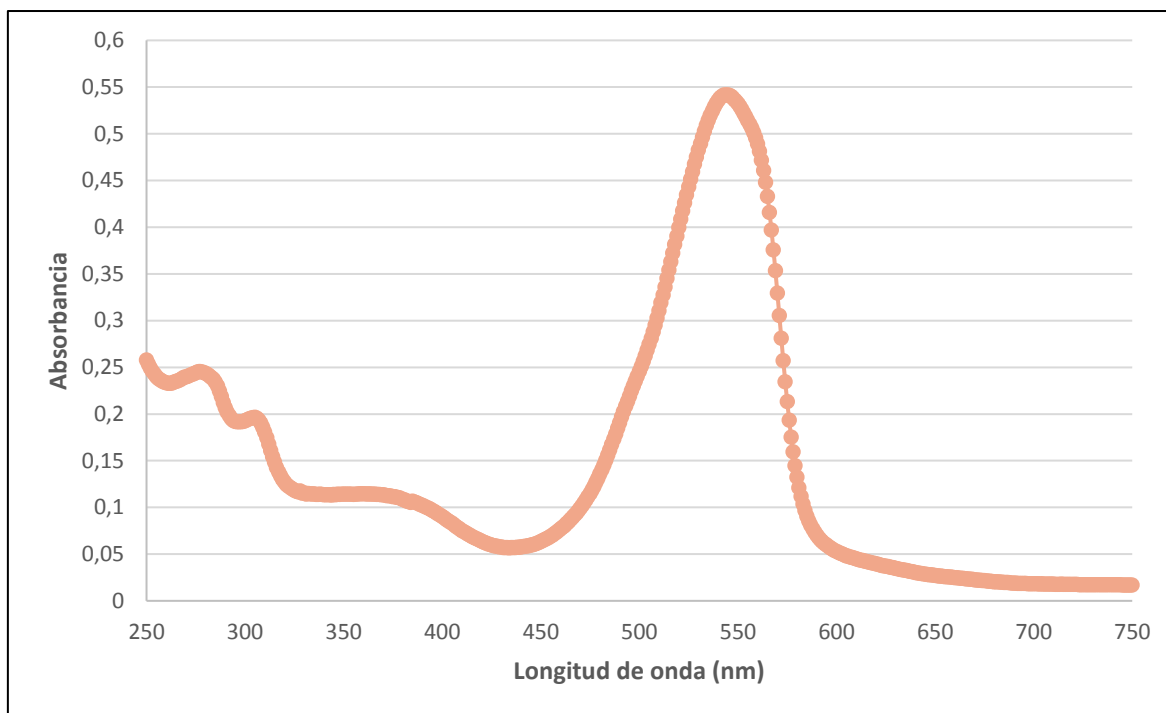


Figura 4.1. Espectro UV-visible muestra B-PE liofilizada

La concentración de B-PE liofilizada resultante es de 1,77 mg/mL, tal y como se indica en la [Tabla 4.2](#), tras aplicar las Ecuaciones espectroscópicas [\(3.2\)](#), [\(3.3\)](#) y [\(3.4\)](#) (Bermejo y col., 2002).

Tabla 4.2. Cálculo de la concentración de la muestra B-PE liofilizada

$A_{620 \text{ nm}}$	0,039440
$A_{650 \text{ nm}}$	0,027190
$A_{565 \text{ nm}}$	0,432870
Factor de dilución	53,33
$\lambda_{\text{máx}} \text{ (nm)}$	544
$[\text{APC}]_{\text{dilución}} \text{ (mg/mL)}$	0,003486
$[\text{R-PC}]_{\text{dilución}} \text{ (mg/mL)}$	0,002765
$[\text{B-PE}]_{\text{dilución}} \text{ (mg/mL)}$	0,033107
$[\text{B-PE}]_{\text{muestra liofilizada}} \text{ (mg/mL)}$	1,77

4.1.1 Espectros de absorción. Ley de Lambert-Beer

Una vez conocida la concentración de B-PE en nuestra muestra procedente de B-PE liofilizada, se procedió a su caracterización mediante los espectros de absorbancia y la Ley de Lambert-Beer. Para ello, a partir de nuestra disolución inicial de B-PE liofilizada, se prepararon nueve tubos de ensayo con diferentes concentraciones de B-PE liofilizada ([Tabla 4.3](#)). Seguidamente, se procedió a registrar los espectros de absorción correspondientes ([Figura 4.2](#)).

Los datos se reflejan en la [Tabla 4.3](#), donde aparecen detalladas las concentraciones de B-PE liofilizada en mg/mL y molaridad obtenidas según las Ecuaciones ([4.1](#)) y ([4.2](#)).

$$[B - PE] \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{Vol. (B - PE liof) (\mu L) \cdot 10^{-3} \cdot [B - PE]_{lio\tilde{f}ilizada} \left(\frac{mg}{mL} \right)}{(Vol. (B - PE liof) (\mu L) + Vol. tamp\acute{o}n fosfato 5mM (\mu L)) \cdot 10^{-3}} \quad Ecuaci\acute{o}n (4.1)$$

Donde $[B-PE]_{muestra\ liofilizada}$ (mg/mL) es de 1,77 mg/mL ([Tabla 4.2](#)).

$$[B - PE] (M) = [B - PE] \left(\frac{mg}{mL} \right) \cdot \frac{10^3 mL}{1 L} \cdot \frac{1 g}{10^3 mg} \cdot \frac{1 mol}{234000 g} \quad Ecuaci\acute{o}n (4.2)$$

Donde 234000 g/mol es el peso molecular de B-PE.

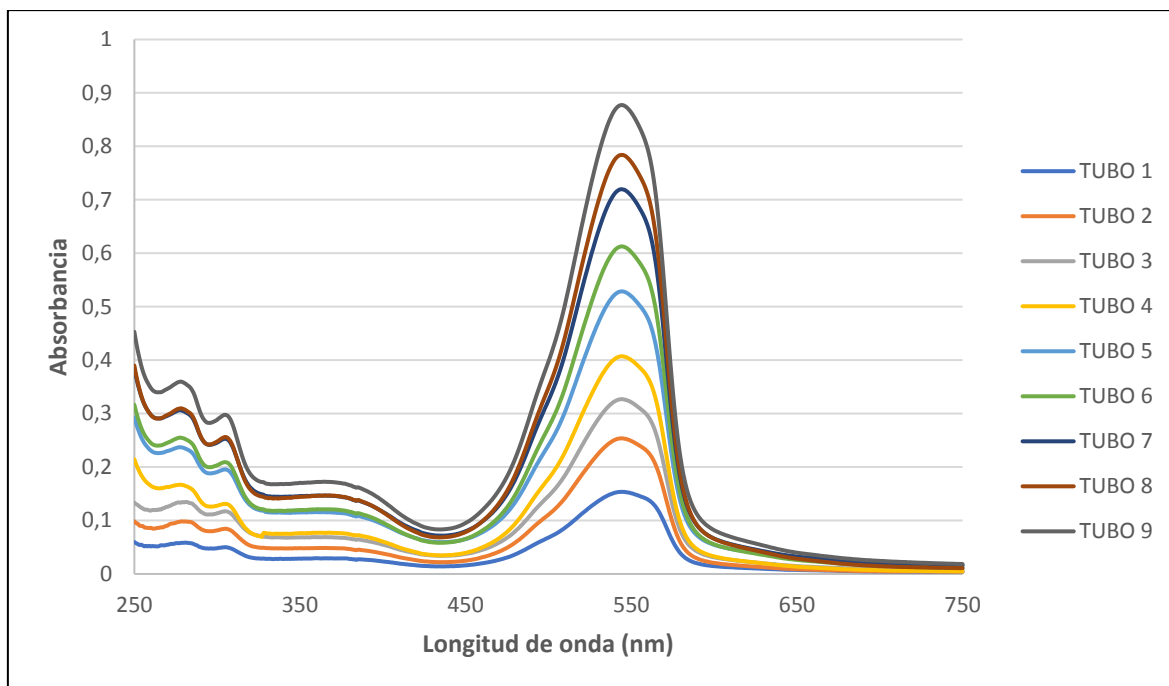


Figura 4.2. Espectros de absorción de la muestra B-PE liofilizada

Tabla 4.3. Caracterización de la muestra B-PE liofilizada mediante la Ley de Lambert-Beer

Nº Tubo	Volumen [B-PE] liofilizada (µL)	Volumen Buffer Fosfato (µL)	[B-PE] liofilizada (mg/mL)	[B-PE] liofilizada (M)	[B-PE] · 10 ⁸ (M) liofilizada	A _{544 nm}
1	15	3985	0,0066375	2,83654E-08	2,83654	0,15363
2	30	3970	0,013275	5,67308E-08	5,67308	0,25371
3	45	3955	0,0199125	8,50962E-08	8,50962	0,32706
4	60	3940	0,02655	1,13462E-07	11,34615	0,40727
5	75	3925	0,0331875	1,41827E-07	14,18269	0,5286
6	90	3910	0,039825	1,70192E-07	17,01923	0,61281
7	105	3895	0,0464625	1,98558E-07	19,85577	0,719809
8	120	3880	0,0531	2,26923E-07	22,69231	0,78392
9	135	3865	0,0597375	2,55288E-07	25,52885	0,877279

Además, aparece una última columna donde se han recopilado los valores de absorbancia de cada tubo para la longitud de onda máxima de absorción (544 nm) de la muestra de B-PE liofilizada ([Tabla 4.3](#)). Representando la absorbancia frente a la concentración se obtiene la Ley de Lambert-Beer ([Figura 4.3](#)).

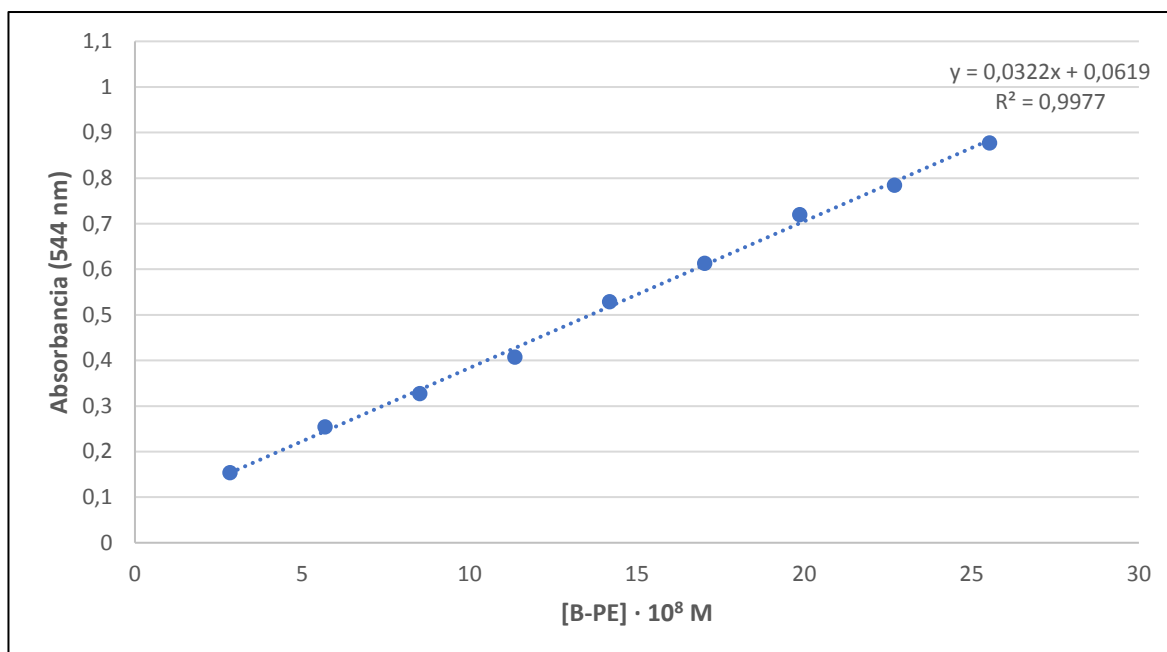


Figura 4.3. Ley de Lambert-Beer para la muestra B-PE liofilizada

Con la ecuación dada por la gráfica de la [Figura 4.3](#), podemos obtener el coeficiente de extinción molar, ϵ ([Tabla 4.4](#)), que se corresponde con la pendiente de la recta de la [Figura 4.3](#).

Tabla 4.4. Comparativa de los coeficientes de extinción molar en muestra B-PE liofilizada utilizada en esta Memoria y B-PE pura (Ruiz Ortega, 2012)

B-PE LIOFILIZADA (544 nm)	$\epsilon = 3,22 \cdot 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)}$
B-PE PURA (545 nm)	$\epsilon = 2,41 \cdot 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)}$

La Ley de Lambert-Beer para la muestra B-PE liofilizada utilizada en esta Memoria será la reflejada en la [Ecuación \(4.3\)](#).

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c = 3,22 \cdot 10^6 \cdot 1 \cdot [B - PE] \quad \text{Ecuación (4.3)}$$

4.1.2 Espectros de fluorescencia. Ley de Kavanagh

Tras caracterizar nuestra muestra B-PE liofilizada mediante la Ley de Lambert-Beer, en este apartado la caracterizaremos desde el punto de vista fluorimétrico mediante la Ley de Kavanagh. Para ello, a partir de la disolución inicial de B-PE liofilizada, se prepararon 12 tubos de ensayo con diferentes concentraciones de B-PE liofilizada ([Tabla 4.6](#)). Seguidamente, se procedió a registrar los espectros de fluorescencia correspondientes mostrados en la [Figura 4.4](#). Los parámetros seleccionados para la elaboración de los espectros han sido los que se recogen en la [Tabla 4.5](#) mostrada a continuación.

Tabla 4.5. Parámetros espectroscópicos para la obtención de los espectros de fluorescencia en la muestra B-PE liofilizada

$\Delta\lambda_{\text{excitación}} = 3 \text{ nm}$
$\Delta\lambda_{\text{emisión}} = 3 \text{ nm}$
Sensibilidad = Media
$\lambda_{\text{excitación}} = 510 \text{ nm}$
Start = 530 nm
End = 650 nm

Tal y como se observa en la [Tabla 4.6](#), aparecen detalladas las concentraciones de B-PE liofilizada en mg/mL y en Molaridad obtenidas con las Ecuaciones [\(4.1\)](#) y [\(4.2\)](#).

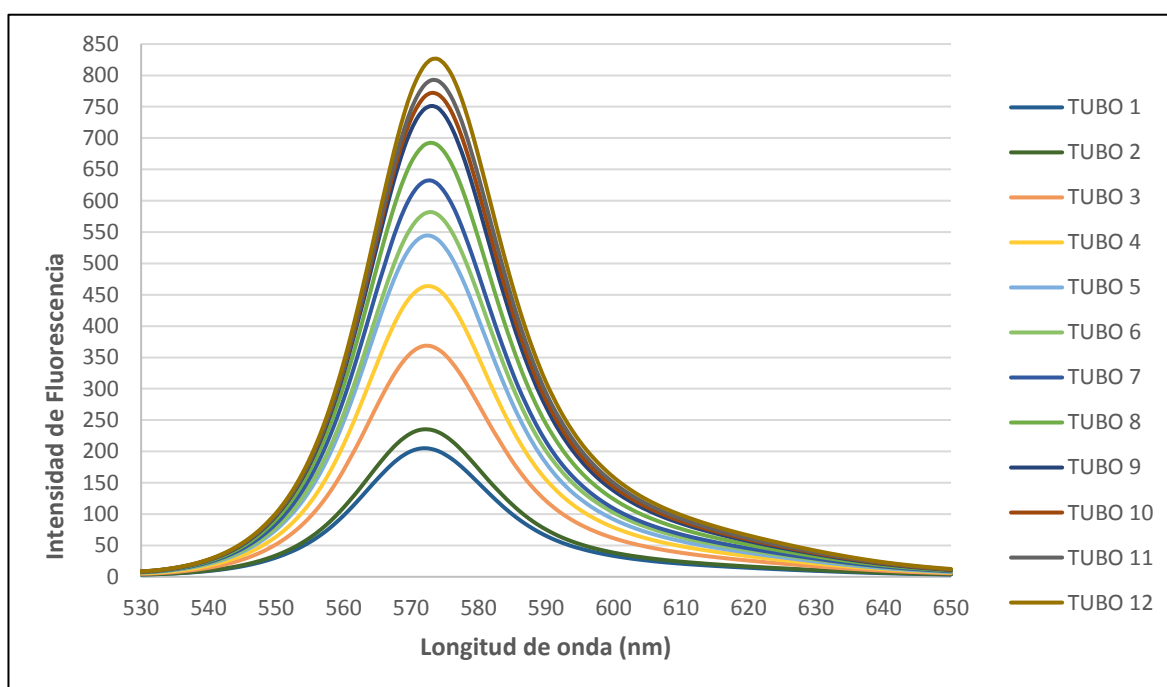


Figura 4.4. Espectros de fluorescencia de la muestra B-PE liofilizada

Tabla 4.6. Caracterización de la muestra B-PE liofilizada mediante la Ley de Kavanagh

Nº Tubo	Volumen [B-PE] liofilizada (µL)	Volumen Buffer Fosfato (µL)	[B-PE] liofilizada (mg/mL)	[B-PE] liofilizada (M)	[B-PE] · 10 ⁸ (M) liofilizada	IF _{573 nm}
1	15	3985	0,0066375	2,83654E-08	2,83654	205,129
2	20	3980	0,00885	3,78205E-08	3,7820512	235,328
3	35	3965	0,0154875	6,61859E-08	6,61858974	368,533
4	50	3950	0,022125	9,45513E-08	9,4551282	463,289
5	60	3940	0,02655	1,13462E-07	11,34615	544,004
6	70	3930	0,030975	1,32372E-07	13,237179	581,907
7	75	3925	0,0331875	1,41827E-07	14,18269	632,122
8	90	3910	0,039825	1,70192E-07	17,01923	692,406
9	105	3895	0,0464625	1,98558E-07	19,85577	751,181
10	120	3880	0,0531	2,26923E-07	22,69231	771,971
11	135	3865	0,0597375	2,55288E-07	25,52885	792,303
12	150	3850	0,066375	2,83654E-07	28,36538	825,992

Además, aparece una última columna donde se han recopilado los valores de intensidad de fluorescencia de cada tubo para su longitud de onda máxima (573 nm). Dichos valores de intensidad de fluorescencia a 573 nm representados frente a la concentración de B-PE liofilizada permiten la obtención de la Ley de Kavanagh ([Figura 4.5](#)).

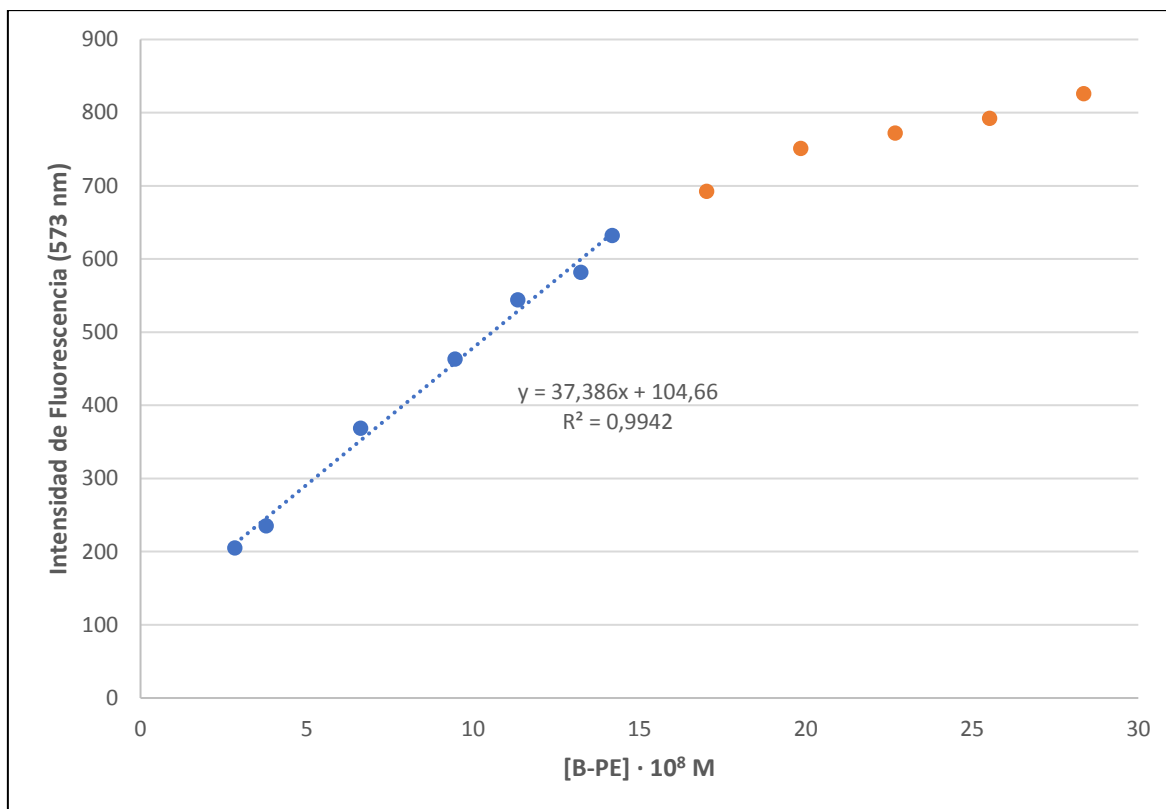


Figura 4.5. Ley de Kavanagh para la muestra B-PE liofilizada

Como podemos observar en la [Figura 4.5](#) los tubos del 1 al 7 conformarían la zona lineal de la Ley de Kavanagh, y los tubos del 8 al 12 conformarían la zona no lineal. Con la ecuación de la zona lineal dada por la gráfica de dicha figura, podemos obtener la constante de Kavanagh, k ([Tabla 4.7](#)), que se corresponde con la pendiente de la recta.

Tabla 4.7. Comparativa de la constante de Kavanagh en muestra B-PE liofilizada utilizada en esta Memoria y B-PE pura (Ruiz Ortega, 2012)

B-PE LIOFILIZADA (573 nm)	$k = 37,386 \cdot 10^8 \text{ L/mol} = 373,86 \cdot 10^7 \text{ (M}^{-1}\text{)}$
B-PE PURA (576 nm)	$k = 527,7 \cdot 10^7 \text{ (M}^{-1}\text{)}$

La Ley de Kavanagh para la muestra B-PE liofilizada utilizada en esta Memoria será la reflejada en la [Ecuación \(4.4\)](#):

$$F = k \cdot c = 373,86 \cdot 10^7 \cdot [B - PE]$$

Ecuación (4.4)

4.2 Caracterización B-PE extracto

Para proceder a la caracterización de la disolución B-PE extracto, partimos de una muestra de biomasa microalgal de la especie *Porphyridium cruentum*, a partir de la cual, mediante un proceso complejo de extracción, se llega a la obtención de extracto B-PE (Bermejo y col., 2003; Bermejo y col., 2006). Este extracto B-PE se encuentra en un medio tampón Fosfato 5 mM a pH 7 previamente preparado a partir de una disolución tampón madre de Fosfato (cantidades para la preparación mostradas en la [Tabla 4.1](#)).

A continuación, preparamos una dilución de esta disolución, de 100 μL de disolución B-PE extracto en 4000 μL de disolución tampón Fosfato 5 mM. Con lo cual, el factor de dilución obtenido fue de 41 ([Ecuación \(3.5\)](#)). Esta dilución es llevada al espectrofotómetro UV-visible para obtener su espectro ([Figura 4.6](#)) y poder calcular así la concentración de B-PE extracto.

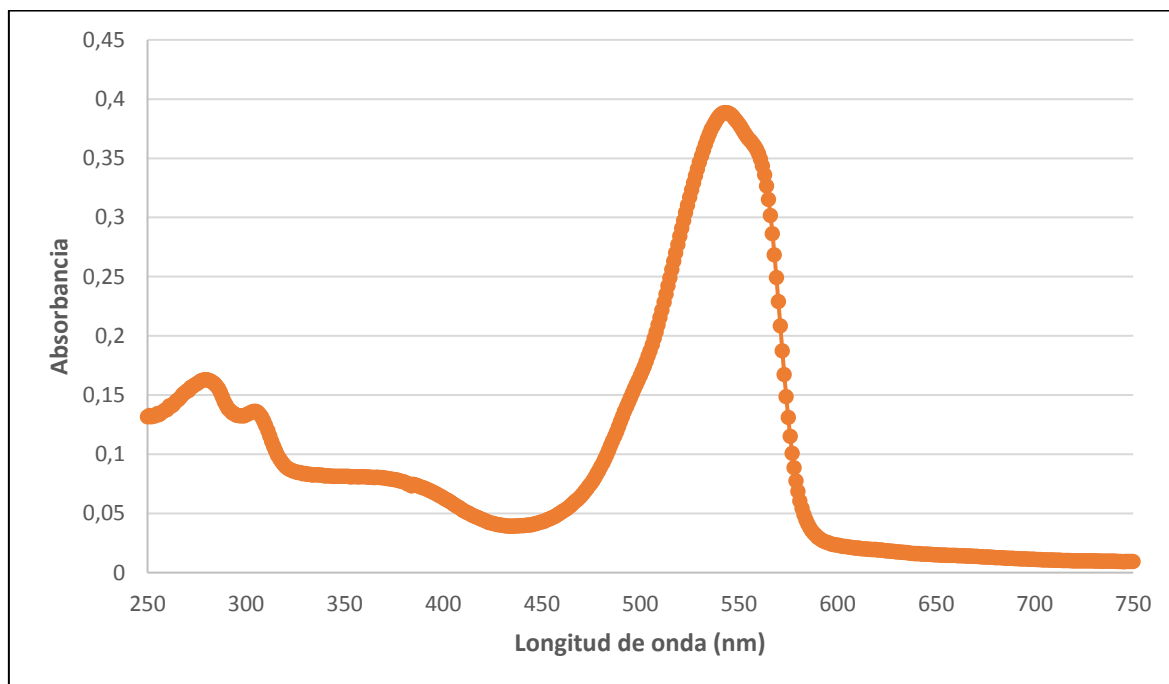


Figura 4.6. Espectro UV-visible muestra B-PE extracto

La concentración de B-PE extracto resultante es de 1 mg B-PE/mL, tal y como se indica en la [Tabla 4.8](#), tras aplicar las Ecuaciones espectroscópicas [\(3.2\)](#), [\(3.3\)](#) y [\(3.4\)](#) (Bermejo y col., 2002).

Tabla 4.8. Cálculo de la concentración de la muestra B-PE extracto

A_{620 nm}	0,019260
A_{650 nm}	0,015080
A_{565 nm}	0,315190
Factor de dilución	41
λ_{máx} (nm)	543
[APC]_{dilución} (mg/mL)	0,002021
[R-PC]_{dilución} (mg/mL)	0,001179
[B-PE]_{dilución} (mg/mL)	0,0243448
[B-PE]_{muestra liofilizada} (mg/mL)	0,998 ≈ 1

4.2.1 Espectros de absorción. Ley de Lambert-Beer

Al igual que en el apartado 4.1.1. Espectros de absorción. Ley de Lambert-Beer para la muestra B-PE liofilizada, una vez conocida la concentración de B-PE en nuestra muestra extracto de microalga roja, primero vamos a proceder a caracterizarla mediante los espectros de absorbancia y la Ley de Lambert-Beer. Para ello, a partir de nuestra disolución inicial de B-PE extracto vamos a preparar diez tubos de ensayo con diferentes volúmenes, los cuales aparecen indicados en la [Tabla 4.9](#).

Seguidamente, se procede a realizar la medición de los diez tubos en el espectrofotómetro UV-visible y la obtención de los espectros de absorción correspondientes ([Figura 4.7](#)).

Tal y como se observa en la [Tabla 4.9](#), aparecen detalladas las concentraciones de B-PE extracto en mg/mL y en Molaridad obtenidas con las Ecuaciones ([4.1](#)) y ([4.2](#)).

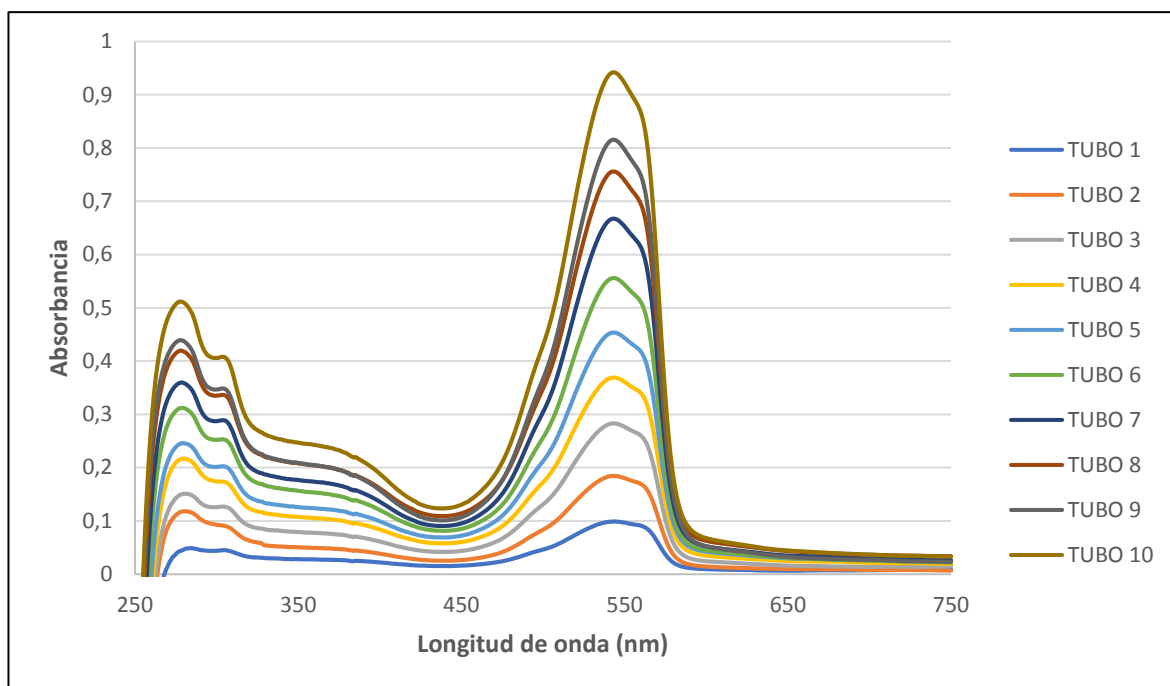


Figura 4.7. Espectros de absorción de la muestra B-PE extracto

Tabla 4.9. Caracterización de la muestra B-PE extracto mediante la Ley de Lambert-Beer

Nº Tubo	Volumen [B-PE] extracto (µL)	Volumen Buffer Fosfato (µL)	[B-PE] extracto (mg/mL)	[B-PE] extracto (M)	[B-PE] · 10 ⁸ (M) extracto	A _{543 nm}
1	26	3974	0,0066375	2,83654E-08	2,83654	0,098989
2	53	3947	0,013275	5,67308E-08	5,67308	0,18445
3	80	3920	0,0199125	8,50962E-08	8,50962	0,28301
4	106	3894	0,02655	1,13462E-07	11,34615	0,36916
5	133	3867	0,0331875	1,41827E-07	14,18269	0,4536
6	159	3841	0,039825	1,70192E-07	17,01923	0,55584
7	186	3814	0,0464625	1,98558E-07	19,85577	0,66738
8	212	3788	0,0531	2,26923E-07	22,69231	0,75576
9	239	3761	0,0597375	2,55288E-07	25,52885	0,81567
10	266	3734	0,066375	2,83654E-07	28,36538	0,94209

Además, aparece una última columna donde se han recopilado los valores de absorbancia de cada tubo para la longitud de onda máxima de absorción (543 nm) de la muestra de B-PE extracto ([Tabla 4.9](#)). Representando la absorbancia frente a la concentración se obtiene la Ley de Lambert-Beer ([Figura 4.8](#)).

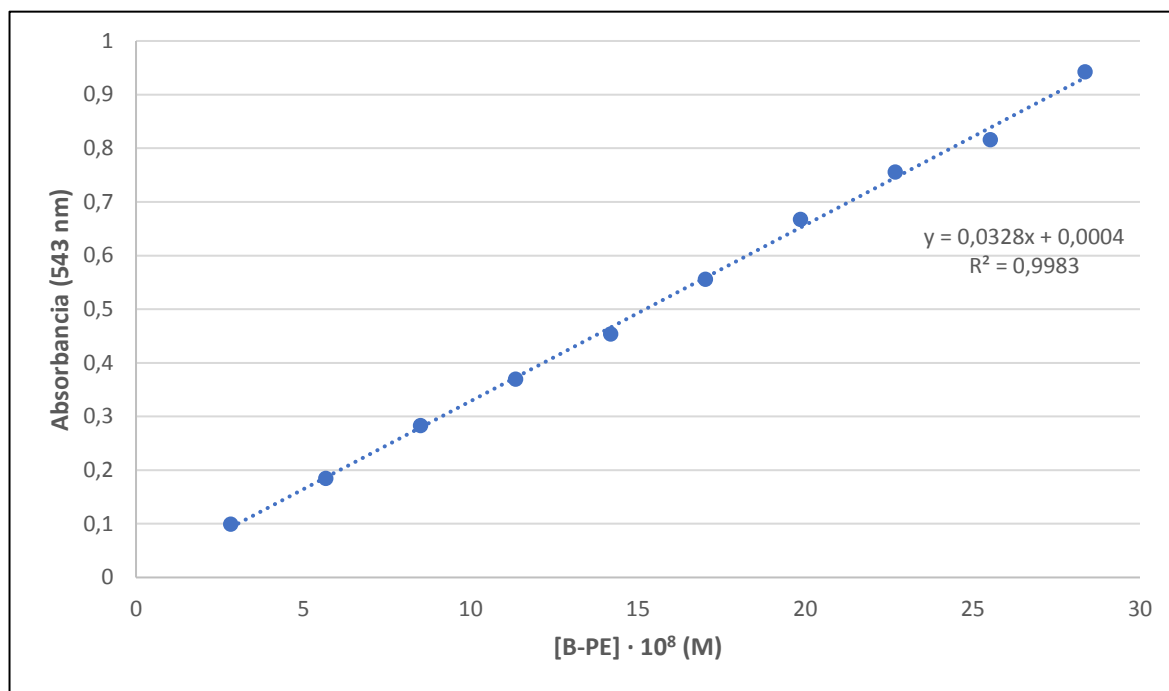


Figura 4.8. Ley de Lambert-Beer para la muestra B-PE extracto

Como podemos observar en la [Figura 4.8](#), los diez tubos preparados se encuentran en la zona lineal de la Ley de Lambert-Beer. Con la ecuación dada por la gráfica de dicha figura, podemos obtener el coeficiente de extinción molar, ϵ ([Tabla 4.10](#)), que se corresponde con la pendiente de la recta.

Tabla 4.10. Comparativa de los coeficientes de extinción molar en muestra B-PE extracto y B-PE pura (Ruiz Ortega, 2012)

B-PE EXTRACTO (543 nm)	$\epsilon = 3,28 \cdot 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)}$
B-PE PURA (545 nm)	$\epsilon = 2,41 \cdot 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)}$

La Ley de Lambert-Beer para la muestra B-PE extracto será la reflejada en la [Ecuación \(4.5\)](#) mostrada a continuación.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c = 3,28 \cdot 10^6 \cdot 1 \cdot [B - PE]$$

Ecuación (4.5)

4.2.2 Espectros de fluorescencia. Ley de Kavanagh

Tras caracterizar la muestra B-PE extracto mediante la Ley de Lambert-Beer, en este apartado la caracterizaremos desde el punto de vista fluorimétrico mediante la Ley de Kavanagh. Para ello, a partir de la disolución inicial de B-PE extracto, se prepararon 11 tubos de ensayo con diferentes concentraciones de B-PE extracto ([Tabla 4.12](#)). Seguidamente, se procedió a registrar los espectros de fluorescencia correspondientes mostrados en la [Figura 4.9](#). Los parámetros seleccionados para la elaboración de los espectros han sido los que se recogen en la [Tabla 4.11](#) mostrada a continuación.

Tabla 4.11. Parámetros espectroscópicos para la obtención de los espectros de fluorescencia en la muestra B-PE extracto

$\Delta\lambda_{\text{excitación}} = 3 \text{ nm}$
$\Delta\lambda_{\text{emisión}} = 3 \text{ nm}$
Sensibilidad = Media
$\lambda_{\text{excitación}} = 490 \text{ nm}$
Start = 530 nm
End = 650 nm

Tal y como se observa en la [Tabla 4.12](#), aparecen detalladas las concentraciones de B-PE extracto en mg/mL y en Molaridad obtenidas con las Ecuaciones ([4.1](#)) y ([4.2](#)).

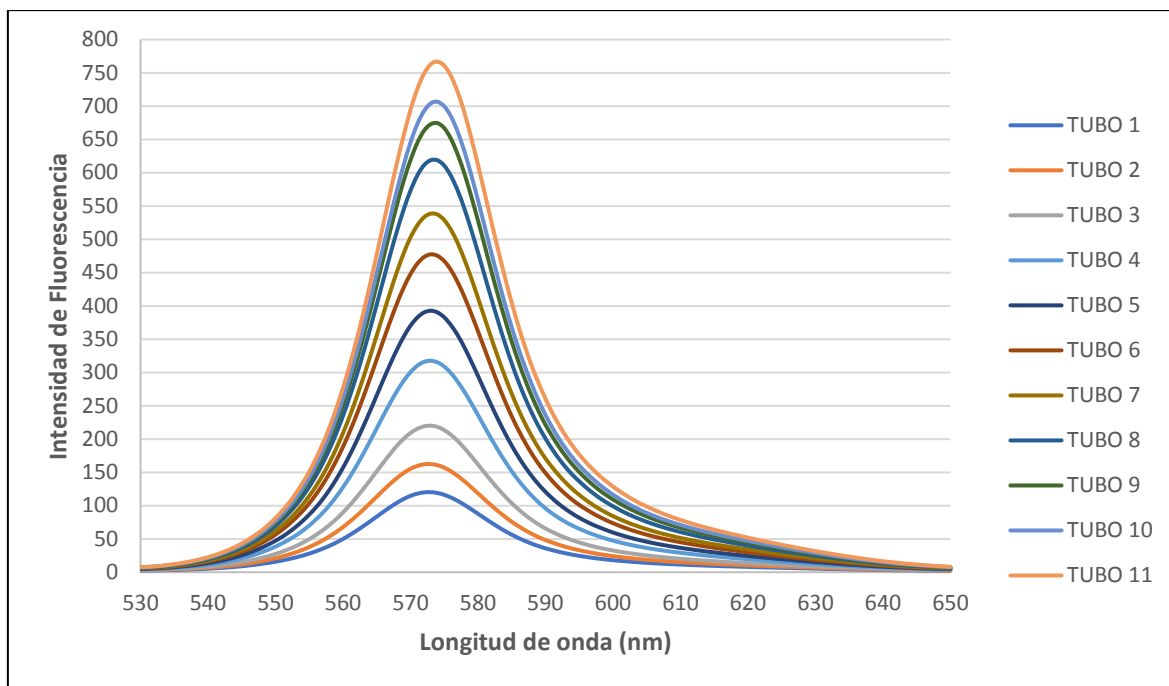


Figura 4.9. Espectros de fluorescencia de la muestra B-PE extracto

Tabla 4.12. Caracterización de la muestra B-PE extracto mediante la Ley de Kavanagh

Nº Tubo	Volumen [B-PE] extracto (µL)	Volumen Buffer Fosfato (µL)	[B-PE] extracto (mg/mL)	[B-PE] extracto (M)	[B-PE] · 10 ⁸ (M) extracto	IF _{573 nm}
1	26	3974	0,0066375	2,83654E-08	2,83654	120,202
2	35	3965	0,00885	3,78205E-08	3,78205	162,351
3	53	3947	0,013275	5,67308E-08	5,67308	220,033
4	80	3920	0,0199125	8,50962E-08	8,50962	317,527
5	106	3894	0,02655	1,13462E-07	11,34615	392,613
6	124	3876	0,030975	1,32372E-07	13,2372	477,346
7	159	3841	0,039825	1,70192E-07	17,01923	538,425
8	186	3814	0,0464625	1,98558E-07	19,85577	618,741
9	212	3788	0,0531	2,26923E-07	22,69231	674,331
10	239	3761	0,0597375	2,55288E-07	25,52885	706,392
11	266	3734	0,066375	2,83654E-07	28,36538	766,684

Además, aparece una última columna donde se han recopilado los valores de intensidad de fluorescencia de cada tubo para su longitud de onda máxima, que nos ha coincidido en el valor de 573 nm. Representando los valores de fluorescencia frente a la concentración de B-PE extracto se obtiene la Ley de Kavanagh correspondiente ([Figura 4.10](#)).

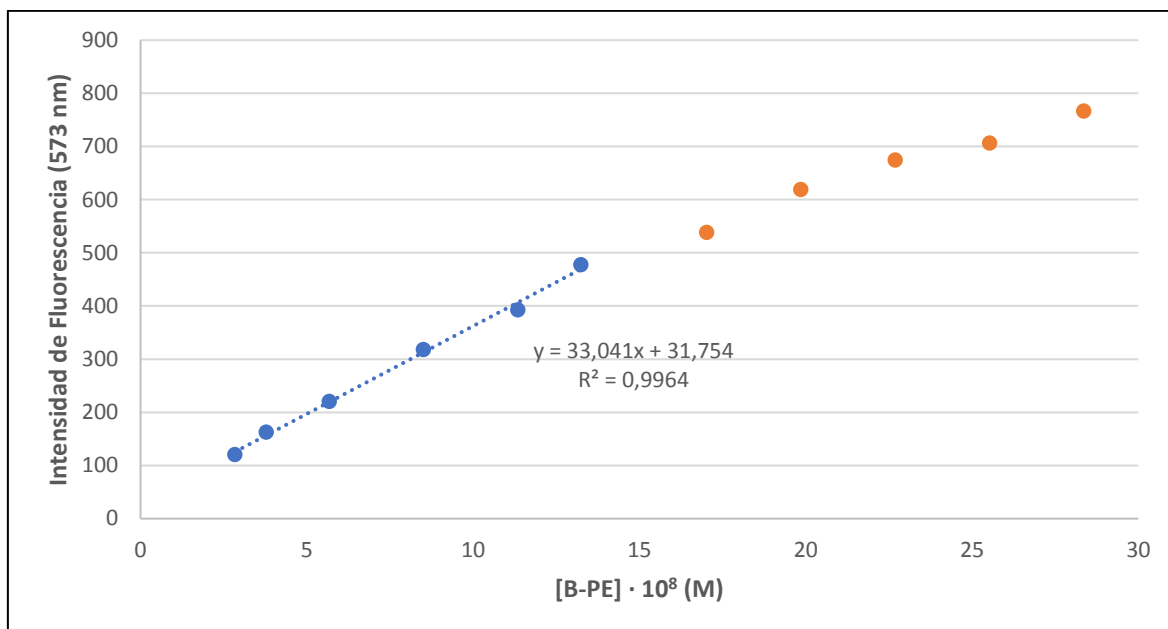


Figura 4.10. Ley de Kavanagh para la muestra B-PE extracto

Como podemos observar en la [Figura 4.10](#) los tubos del 1 al 6 conformarían la zona lineal de la Ley de Kavanagh, y los tubos del 7 al 11 conformarían la zona no lineal. Con la ecuación de la zona lineal dada por la gráfica de dicha figura, podemos obtener la constante de Kavanagh, k ([Tabla 4.13](#)), que se corresponde con la pendiente de la recta.

Tabla 4.13. Comparativa de la constante de Kavanagh en muestra B-PE extracto y B-PE pura (Ruiz Ortega, 2012)

B-PE EXTRACTO (573 nm)	$k = 33,041 \cdot 10^8 \text{ L/mol} = 330,41 \cdot 10^7 \text{ (M}^{-1}\text{)}$
B-PE PURA (576 nm)	$k = 527,7 \cdot 10^7 \text{ (M}^{-1}\text{)}$

La Ley de Kavanagh para la muestra B-PE extracto será la reflejada en la [Ecuación \(4.6\)](#) mostrada a continuación.

$$F = k \cdot c = 330,41 \cdot 10^7 \cdot [B - PE]$$

Ecuación (4.6)

4.3 Estabilidad del colorante natural B-PE liofilizada a diferentes pH

Este apartado tiene como objetivo el estudio de la estabilidad del colorante natural a diferentes valores de pH, utilizando para ello espectroscopía UV-visible y espectroscopía de fluorescencia. Tanto los espectros de absorbancia como los espectros de fluorescencia nos ofrecen información sobre las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, además de permitirnos comparar la estabilidad de las macromoléculas en función del valor de pH del medio en que se encuentran disueltas.

Se prepararon disoluciones tampón fosfato de 10 mL cada una para diferentes pH. Los pH 5,0, 5,50, 6,0, 6,50, 7,0, 7,50, 8,0, se obtienen mezclando las cantidades adecuadas de Potasio Dihidrógeno Fosfato (KH_2PO_4) y de Sodio Hidrógeno Fosfato 12-Hidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), tal y como se muestra en la [Tabla 4.14](#). Para obtener las disoluciones de pH ácido 3,0 y 4,0, es necesaria la adición de Ácido Clorhídrico (HCl) 1 M a la disolución tampón de pH 5,0; y las disoluciones de pH básico 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 y 12,0, es necesaria la adición de Hidróxido Potásico (NaOH) 1 M a la disolución tampón de pH 8,0.

Tabla 4.14. Cantidades (en gramos) de Potasio Dihidrógeno Fosfato (KH_2PO_4) y de Sodio Hidrógeno Fosfato 12-Hidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) necesarias para producir 10 mL tampón buffer fosfato 0,5 M

pH teórico	KH_2PO_4 (g / 10 mL)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (g / 10 mL)
5,0	0,6583	0,0190
5,50	0,6160	0,0560
6,0	0,5130	0,1470
6,50	0,3332	0,3033
7,0	0,1590	0,4570
7,50	0,0600	0,5440
8,0	0,0201	0,5800

Se pesan las cantidades mostradas en la [Tabla 4.14](#) en una balanza analítica, sobre papel encerado, para así evitar perder en el trasvase la menor cantidad de muestra posible. Las diferentes pesadas para cada pH se van disolviendo en una pequeña cantidad de agua destilada que se ha introducido previamente en un matraz aforado de 10 mL. Agitamos hasta su completa disolución y enrasamos con agua destilada con ayuda de una pipeta Pasteur. Tapamos con su tapón correspondiente y homogeneizamos la disolución. Para las disoluciones ácidas de pH 3,0 y 4,0, preparamos dos matraces de 10 mL de pH 5,0 y

mientras que medimos con un pHmetro con agitador, vamos añadiendo gota a gota Ácido Clorhídrico (HCl) 1 M hasta conseguir el pH ácido deseado. De igual forma, para las disoluciones básicas de 9,0, 10,0, 11,0 y 12,0, preparamos cuatro matraces de 10 mL de pH 8,0 y mientras que medimos con un pHmetro con agitador, vamos añadiendo gota a gota Hidróxido Sódico (NaOH) 1 M hasta conseguir el pH básico deseado ([Imagen 4.1](#)).

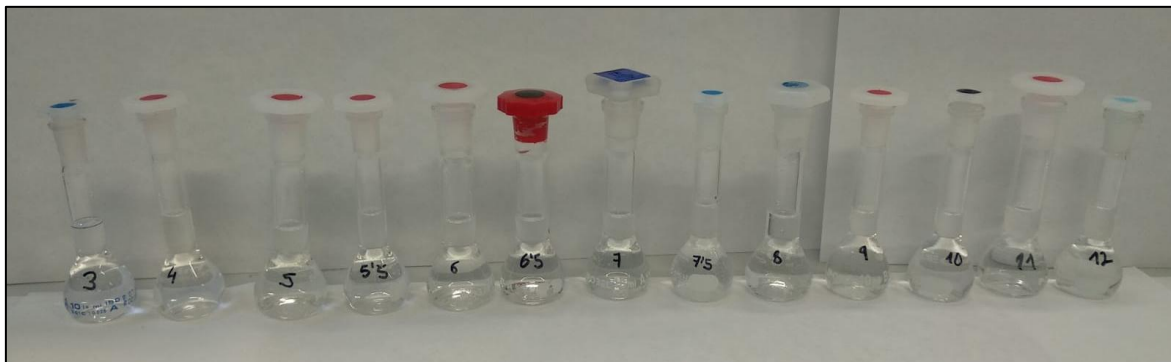


Imagen 4.1. Disoluciones tampón fosfato a diferentes pH

El pH experimental de cada disolución tampón fosfato se verificará con la ayuda de un instrumento medidor de pH con microelectrodo ([Tabla 4.15](#)). En cierto modo, el pH experimental a veces difiere del pH teórico, esto se puede deber a los pequeños errores en la pesada o a la hidratación de los reactivos químicos utilizados, debido por ejemplo al hecho de que, al abrir los botes de los reactivos, éstos van captando la humedad presente en el ambiente, de manera que su peso irá aumentando con el tiempo.

Tabla 4.15. Verificación de los diferentes pH teóricos con ayuda de un instrumento medidor de pH

pH teórico	pH experimental
3,00	3,01
4,0	3,89
5,0	5,0
5,50	5,49
6,0	6,13
6,50	6,45
7,0	6,94
7,50	7,40
8,0	7,97
9,0	9,42
10,0	10,09
11,0	11,03
12,0	11,98

Para llevar a cabo el análisis espectrofotométrico de nuestra B-PE liofilizada, se prepararán 13 tubos eppendorf o tubos de microcentrífuga sobre una gradilla. La concentración de B-PE liofilizada de cada tubo tiene que ser de un valor concreto, de tal forma que tanto las medidas de absorbancia como las medidas de fluorescencia se encuentren tanto en la zona lineal de la Ley de Lambert-Beer, como en la zona lineal de la Ley de Kavanagh.

El valor concreto elegido de concentración de B-PE liofilizada que tendrá cada tubo eppendorf será de $6,5 \cdot 10^{-8}$ M, o lo que es igual $15,2 \cdot 10^{-3}$ mg/mL, ya que es una concentración que como se puede observar en las gráficas de la Ley de Lambert-Beer y en la de la Ley de Kavanagh para la muestra B-PE liofilizada, se encuentra en la zona lineal en ambas leyes, más concretamente entre las concentraciones de los tubos 2 y 3. Una vez elegida la concentración, debemos traducirla al volumen que verteremos en el tubo eppendorf con cada medio tampón buffer fosfato para que tenga dicha concentración. Mediante la ley de las diluciones, si cada tubo eppendorf tiene un volumen de 1500 μ L y queremos que tenga una concentración de $15,2 \cdot 10^{-3}$ mg/mL, tendremos que coger 12,8 μ L de la disolución B-PE liofilizada de concentración 1,766 mg/mL. Resumiendo, a cada tubo eppendorf con ayuda de una micropipeta le echaremos 1500 μ L de cada disolución tampón buffer fosfato a un determinado pH y 12,8 μ L de la disolución B-PE liofilizada de

concentración 1,77 mg/mL, para conseguir tener una concentración final de B-PE liofilizada de $15,2 \cdot 10^{-3}$ mg/mL y encontrarnos en la zona lineal de ambas leyes ([Imagen 4.2](#)).



Imagen 4.2. Muestras de B-PE liofilizada analizadas mediante espectroscopía UV-visible y espectroscopía de fluorescencia. La B-PE liofilizada se mezcla con el tampón fosfato a diferentes pH, desde 3,01 (extremo izquierdo) hasta pH 11,98 (extremo derecho)

Se puede observar en la [Imagen 4.2](#) que a medida que el pH aumenta, es decir, a medida que el medio se vuelve más básico, la disolución de los tubos eppendorf pierden la coloración característica de esta proteína, ya que la proteína tiende a desnaturalizarse a ciertos valores de pH, perdiendo su estructura secundaria característica de Hélice α , más concretamente estructura de hexámeros.

4.3.1 Espectros de absorción

Una vez preparados los 13 tubos eppendorf, se procede a realizar sus correspondientes espectros de absorbancia mediante el espectrofotómetro UV-visible. En la [Figura 4.11](#), se pueden observar los diferentes espectros de absorbancia a los diferentes pH seleccionados.

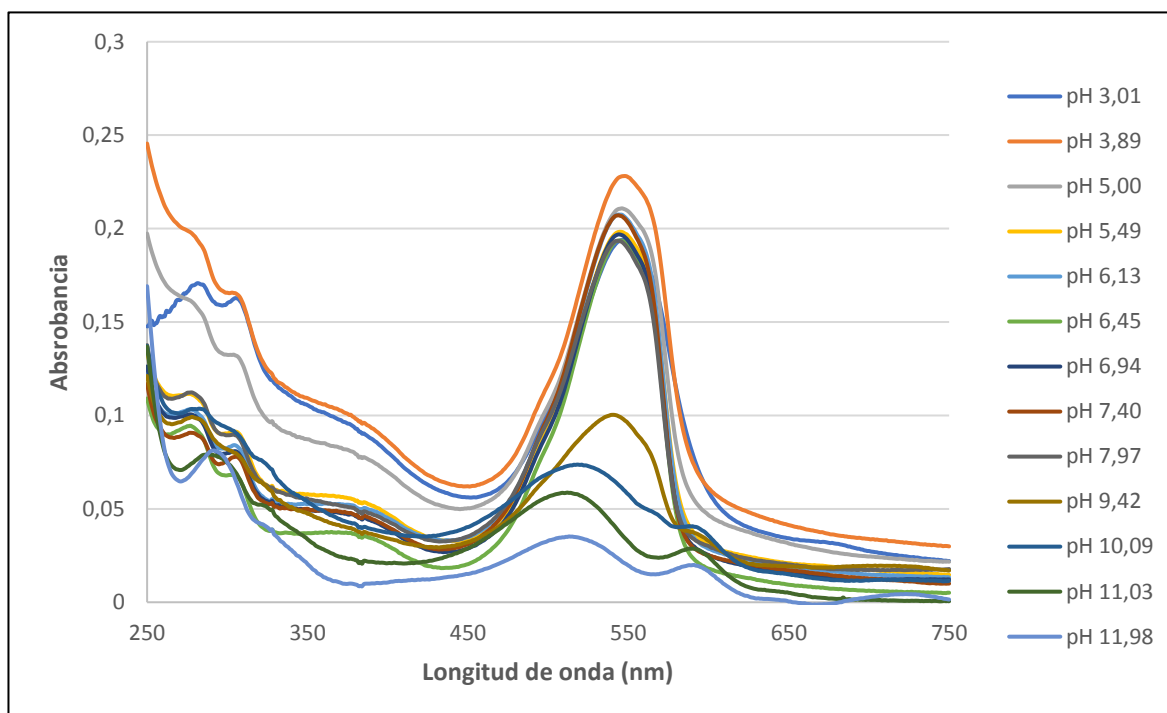


Figura 4.11. Espectros de absorbancia de la muestra B-PE liofilizada a diferentes pH (de pH 3,01 hasta pH 11,98). La Leyenda se encuentra en la derecha

La forma característica del espectro de absorbancia de la B-PE liofilizada se mantiene desde pH 5,00 hasta pH 9,42. A partir de pH 10,09 hasta pH 11,98, vemos como el máximo se desplaza hacia la izquierda y va perdiendo la forma característica del espectro de la B-PE liofilizada.

4.3.2 Espectros de fluorescencia

Realizados los espectros de absorción, se procede a realizar los correspondientes espectros de fluorescencia mediante el espectrofluorímetro, seleccionando los parámetros que refleja la [Tabla 4.16](#). En Figura 4.12, se pueden observar los diferentes espectros de fluorescencia a los diferentes pH seleccionados.

Tabla 4.16. Parámetros establecidos para la obtención de los espectros de fluorescencia en la muestra B-PE liofilizada a diferentes pH

$\Delta\lambda_{\text{excitación}} = 3 \text{ nm}$
$\Delta\lambda_{\text{emisión}} = 3 \text{ nm}$
Sensibilidad = Media
$\lambda_{\text{excitación}} = 490 \text{ nm}$
Start = 510 nm
End = 650 nm

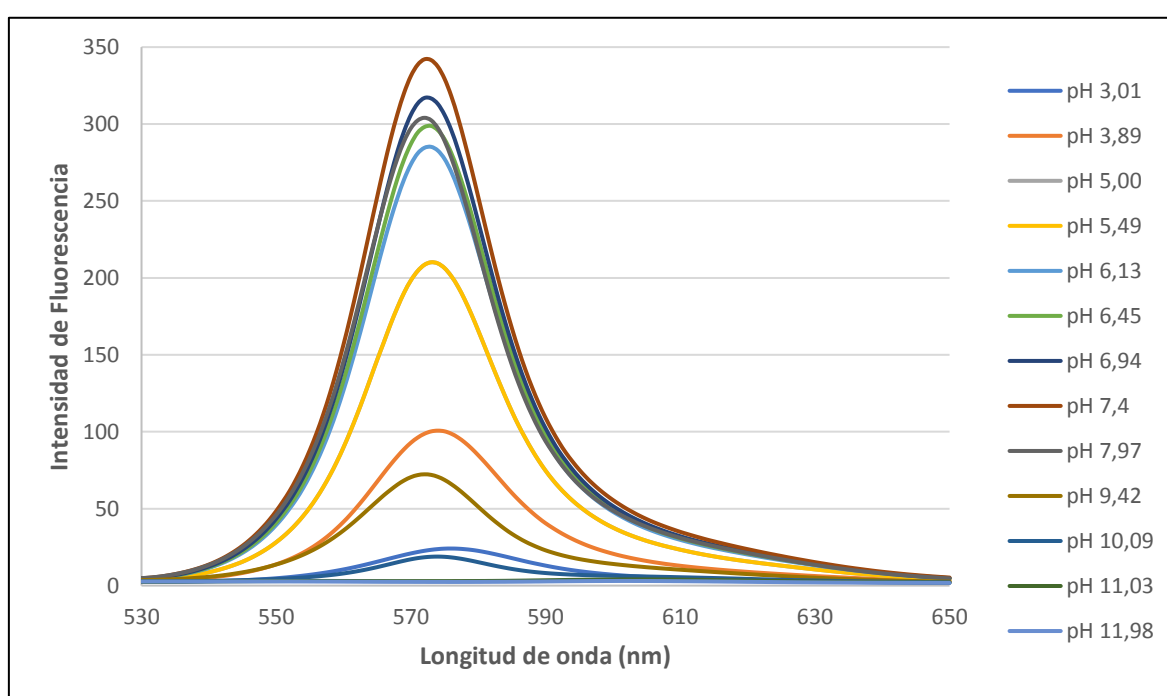


Figura 4.12. Espectros de fluorescencia de la muestra B-PE liofilizada a diferentes pH (de pH 3,01 hasta pH 11,98). La Leyenda se encuentra en la derecha

La forma característica del espectro de fluorescencia de la B-PE liofilizada se mantiene desde pH 5,00 hasta pH 7,97. En pH como 3,89 y 9,42, vemos como el máximo se desplaza hacia la izquierda y va perdiendo la forma característica. Para los pH 3,01, 10,09, 11,03 y 11,98 se pierde la forma del espectro de fluorescencia por completo.

Posteriormente se realizó un análisis adicional, donde se anotaron los diferentes valores de absorbancia a la longitud de onda máxima de 544 nm y los diferentes valores de intensidad de fluorescencia a la longitud de onda máxima de 573 nm ([Tabla 4.17](#)). Ambos valores se representaron gráficamente tal y como se muestra en la [Figura 4.13](#).

Tabla 4.17. Valores de absorbancia a $\lambda_{\text{máx}} = 544 \text{ nm}$ y valores de intensidad de fluorescencia a $\lambda_{\text{máx}} = 573 \text{ nm}$, para las disoluciones de B-PE liofilizada a diferentes

pH		
pH experimental	A_{544 nm}	IF_{573 nm}
3,01	0,00345	23,2453
3,89	0,05144	100,209
5	0,12256	210,141
5,49	0,14417	242,552
6,13	0,16791	285,189
6,45	0,17866	298,781
6,94	0,19689	316,662
7,4	0,20711	341,584
7,97	0,1934	302,491
9,42	0,09949	71,9663
10,09	0,062729	18,7433
11,03	0,03805	2,92047
11,98	0,02317	2,38779

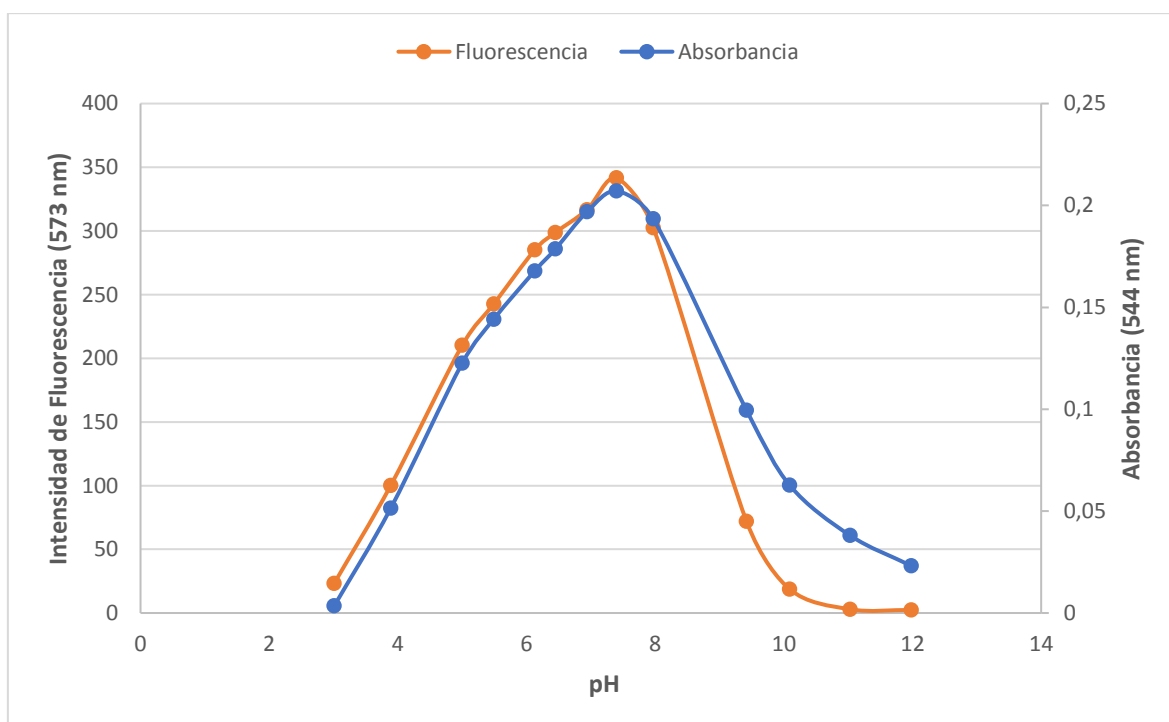


Figura 4.13. Representación de valores de absorbancia a $\lambda_{\text{máx}} = 544 \text{ nm}$ y valores de intensidad de fluorescencia a $\lambda_{\text{máx}} = 573 \text{ nm}$, para las disoluciones de B-PE liofilizada a diferentes pH. La leyenda se encuentra la zona superior

4.4 Obtención de bebidas tónicas con el colorante BPE liofilizada

En este apartado pondremos en práctica el método de la colorimetría mediante la adición a matrices alimentarias (apartado 3.2.1. Adición a las matrices alimentarias del colorante liofilizado) como en nuestro caso lo son las bebidas tónicas, de colorante natural B-PE liofilizada.

4.4.1 Curva de color y aproximación al color atractivo en Tónica Original

Primeramente, se comienza estudiando el comportamiento del color en la bebida tónica de la marca Original con la adición de la muestra de colorante B-PE liofilizada en relación al patrón de referencia. En nuestro caso, nuestro patrón de referencia será la tónica Original Berries (color rosa) y nuestra muestra será la tónica Original Yuzu (incolora) a la que se le irá adicionando nuestra muestra de colorante B-PE liofilizada hasta conseguir un color similar al comercial Original Berries. A partir de este ensayo, se ha conseguido elaborar la [Figura 4.14](#).



Imagen 4.3. Bebida tónica Original Yuzu (incolora, parte izquierda) y tónica Original Berries (rosa, parte derecha)

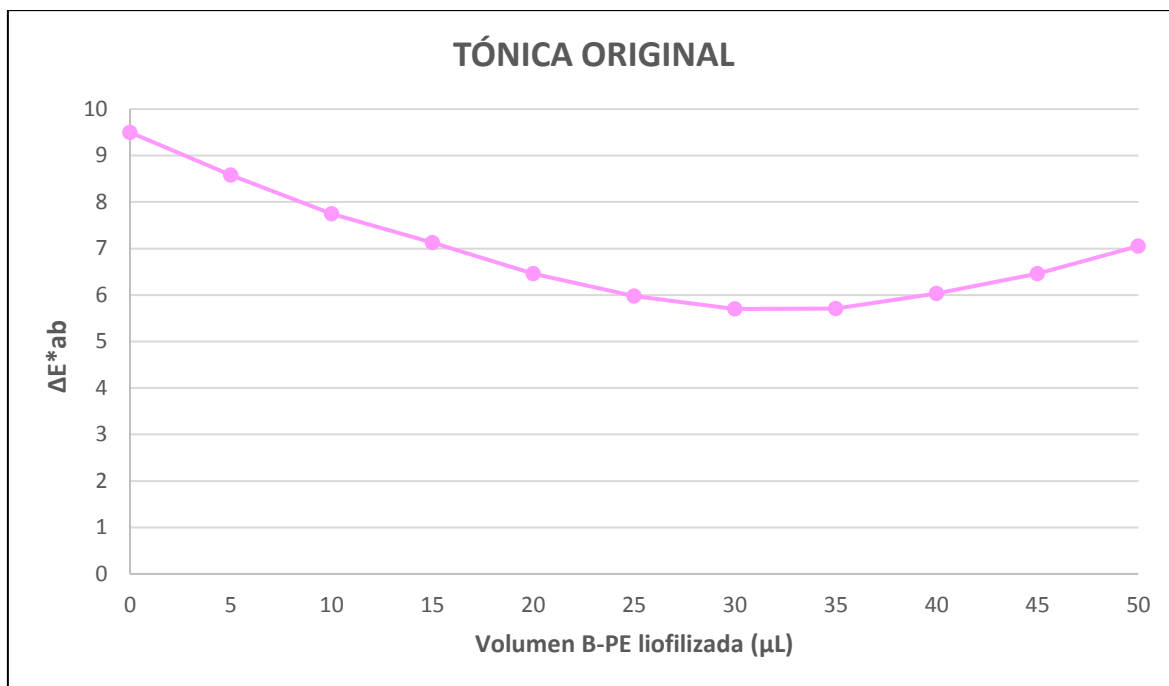


Figura 4.14. Curva de coloración bebida tónica marca Original

Como podemos observar en la gráfica anterior, en el eje horizontal representamos el volumen de muestra B-PE liofilizada que vamos adicionando a la cubeta donde se encuentra la tónica Original Yuzu (incolora), y en el eje vertical, representamos el parámetro ΔE^*_{ab} , que nos indica la diferencia de color en unidades CIELAB entre la cubeta patrón (tónica Original Berries) y la cubeta con la tónica Original Yuzu (incolora) a la que se le añade la muestra de nuestro colorante B-PE liofilizada. De este modo, y de manera muy rápida visualmente, se puede observar que a medida que vamos añadiendo B-PE liofilizada, el parámetro ΔE^*_{ab} se va reduciendo progresivamente, ya que cada vez nos vamos acercando más a un color similar al de nuestra muestra patrón comercial.

En este ensayo, se muestra que la bebida tónica Original no alcanza un valor de ΔE^*_{ab} por debajo de 5, el cual es considerado como el valor a partir del cual podríamos empezar a suponer que dos colores son lo suficiente similares entre sí. Por debajo de este valor, el ojo humano no es capaz de apreciar la diferencia de color. El valor más próximo a 5 alcanzado ha sido de $\Delta E^*_{ab} = 5,70$, cuando se ha añadido un volumen de B-PE liofilizada de 30 μL . Aparentemente de color son muy similares, pero de tonalidad de la cubeta con B-PE liofilizada tiene un color rosa más intenso y más llamativo que el de la cubeta patrón con tónica Original Berries ([Imagen 4.4](#)).

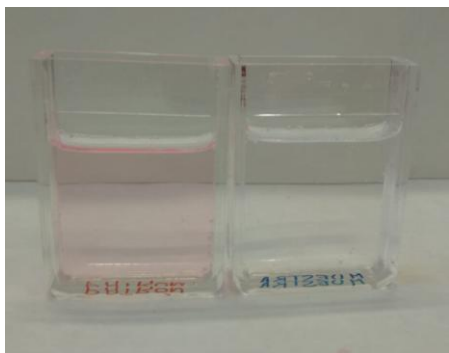
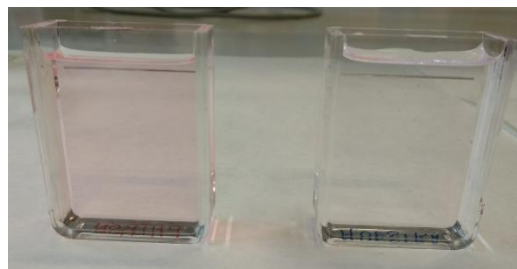
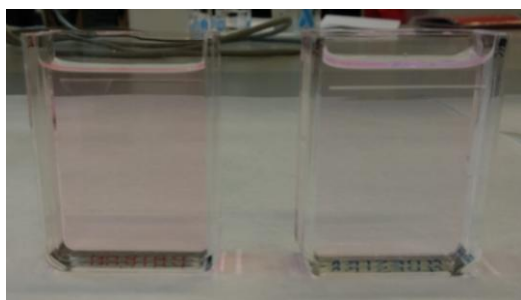


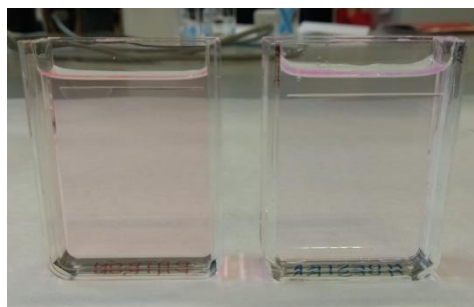
FOTO INICIAL ($\Delta E^*ab = 9,50$)



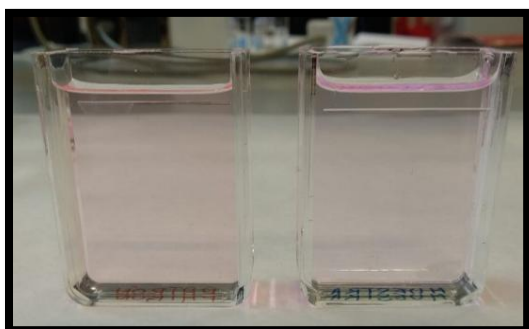
10 μ L ($\Delta E^*ab = 7,75$)



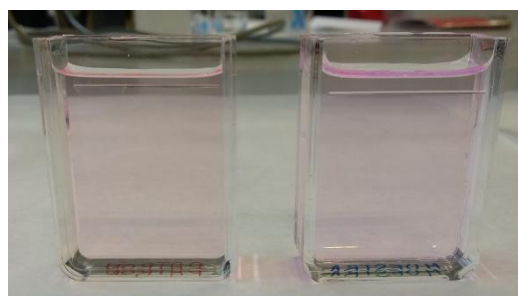
20 μ L ($\Delta E^*ab = 6,46$)



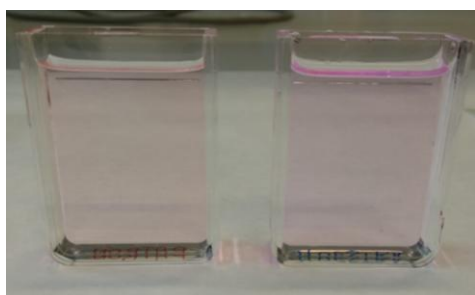
25 μ L ($\Delta E^*ab = 5,98$)



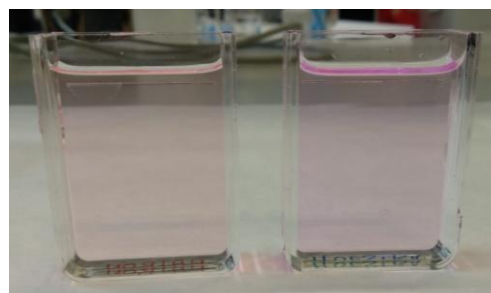
30 μ L ($\Delta E^*ab = 5,70$)



35 μ L ($\Delta E^*ab = 5,71$)



40 μ L ($\Delta E^*ab = 6,03$)



50 μ L ($\Delta E^*ab = 7,05$)

Imagen 4.4. Evolución del aspecto de las muestras durante el ensayo de colorimetría en Tónica Original con B-PE liofilizada

Seguidamente tras este ensayo se ha calculado el factor de tinción siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.2. Cálculo de los factores de tinción [\(Tabla 4.18\)](#).

Tabla 4.18. Factor de tinción ensayo bebida tónica Original con el colorante natural B-PE liofilizada

Bebida	Concentración B-PE liofilizada	Volumen B-PE liofilizada $\Delta E^*_{ab} \approx 5$	FACTOR DE TINCIÓN (mg/mL)	FACTOR DE TINCIÓN (mg/L)
Tónica marca Original	1,766 mg/mL	30 μ L	0,0037847	3,7847

Por último, se ha realizado el ensayo de aproximación al color atractivo comercialmente hablando, donde buscamos un color más intenso al comercial, un color más llamativo al ojo humano. A la cubeta con los 14 mL de tónica Original incolora, le vamos añadiendo con ayuda de micropipetas diferentes volúmenes de nuestro colorante B-PE liofilizada de concentración 1,77 mg/mL hasta llegar a un color atractivo a la vista para su venta. Cada adición de B-PE liofilizada llevará asociada una medida en el colorímetro (respecto a la cubeta patrón con tónica Original Yuzu incolora) y una foto de la cubeta para ir viendo la evolución visual del color [\(Imagen 4.5\)](#). A partir de este ensayo, se ha conseguido elaborar la [Figura 4.15](#).

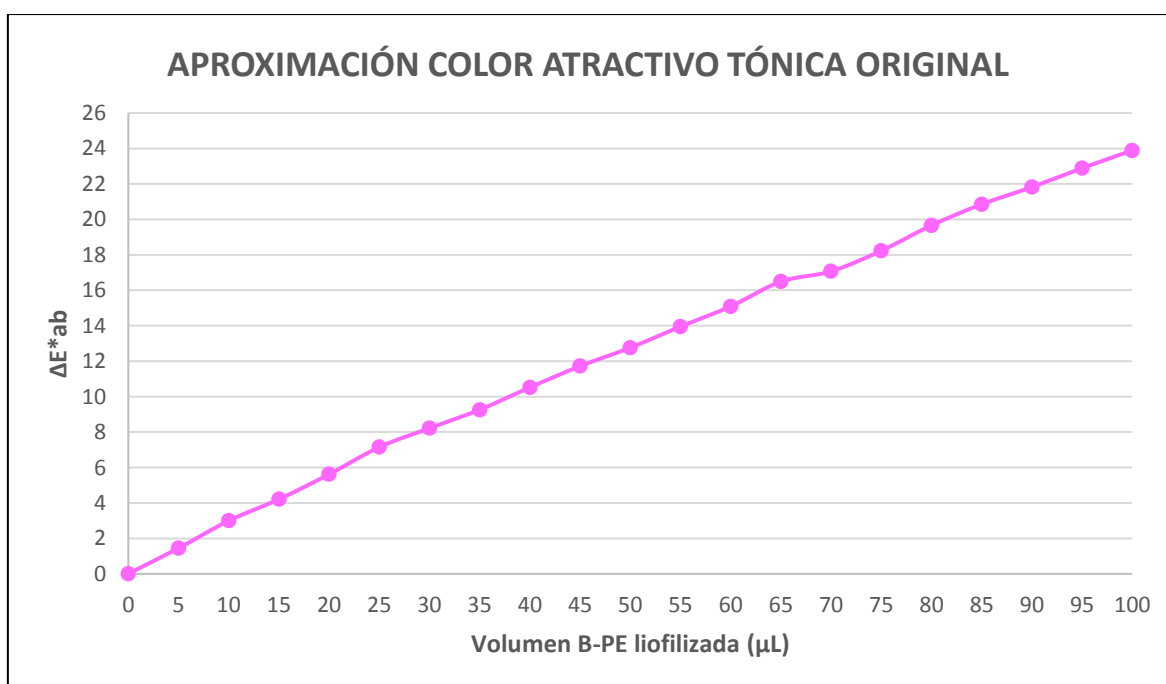
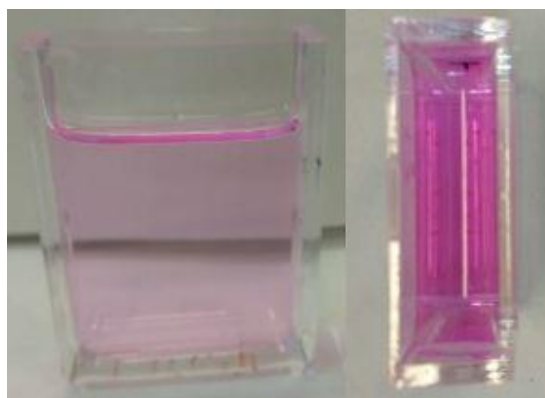


Figura 4.15. Ensayo aproximación al color atractivo bebida tónica marca Original



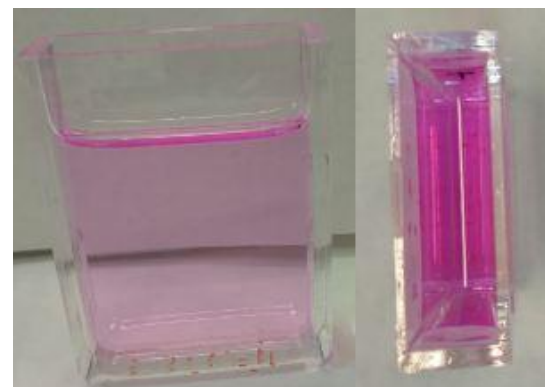
65 μL ($\Delta E^*_{ab} = 16,49$)



75 μL ($\Delta E^*_{ab} = 18,23$)



80 μL ($\Delta E^*_{ab} = 19,66$)



95 μL ($\Delta E^*_{ab} = 22,89$)



100 μL ($\Delta E^*_{ab} = 23,89$)

Imagen 4.5. Evolución del aspecto de las cubetas durante el ensayo de aproximación al color atractivo en Tónica Original con B-PE liofilizada

4.4.2 Curva de color y aproximación al color atractivo en Tónica Schweppes

Se comienza estudiando el comportamiento del color en la bebida tónica de la marca Schweppes con la adición de la muestra de colorante B-PE liofilizada en relación al patrón de referencia. En nuestro caso, nuestro patrón de referencia será la tónica Schweppes Pink (color rosa) y nuestra muestra será la tónica Schweppes incolora a la que se le irá adicionando nuestra muestra de colorante B-PE liofilizada hasta conseguir un color similar al comercial Pink Schweppes. A partir de este ensayo, se ha conseguido elaborar la [Figura 4.16](#).



Imagen 4.6. Bebida tónica Schweppes (incolora, parte derecha) y tónica Schweppes Pink (rosa, parte izquierda)

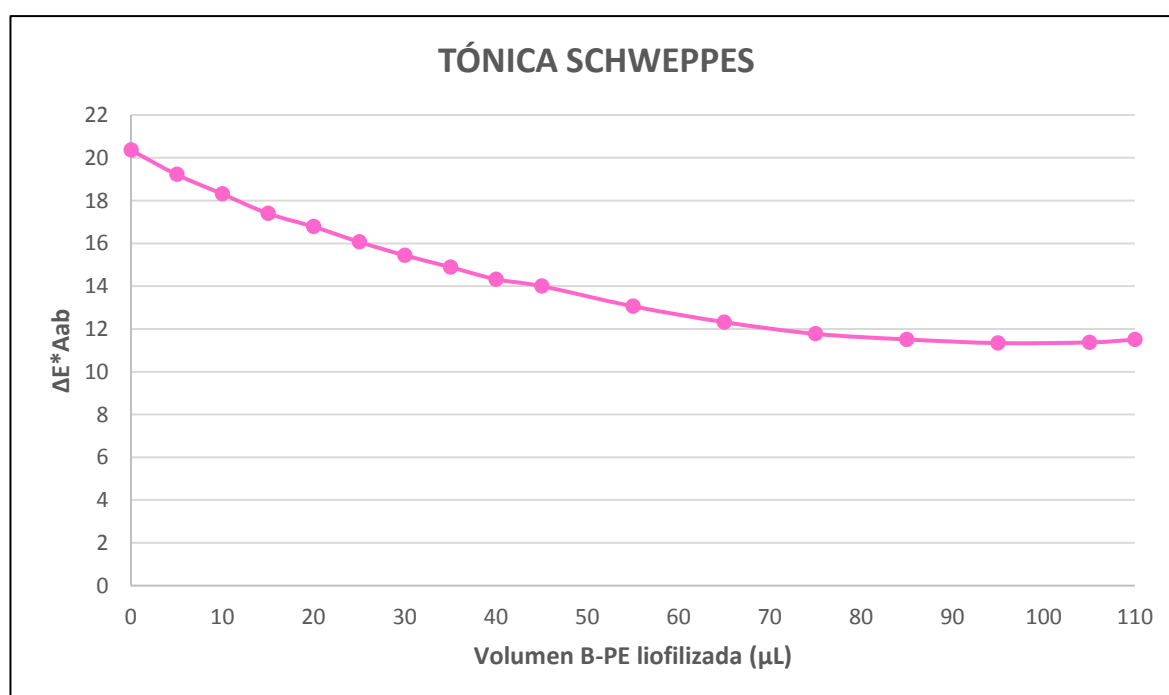


Figura 4.16. Curva de coloración bebida tónica marca Schweppes

Como podemos observar en la gráfica anterior, en el eje horizontal representamos el volumen de muestra B-PE liofilizada que vamos adicionando a la cubeta donde se encuentra la tónica Schweppes incolora, y en el eje vertical, representamos el parámetro ΔE^*ab , que nos indica la diferencia de color en unidades CIELAB entre la cubeta patrón (tónica Schweppes Pink) y la cubeta con la tónica Schweppes incolora a la que se le añade la muestra de nuestro colorante B-PE liofilizada. De este modo, y de manera muy rápida visualmente, se puede observar que a medida que vamos añadiendo B-PE liofilizada, el parámetro ΔE^*ab se va reduciendo progresivamente, ya que cada vez nos vamos acercando más a un color similar al de nuestra muestra patrón comercial.

En este ensayo, se muestra que la bebida tónica Schweppes no alcanza un valor de ΔE^*ab por debajo de 5, el cual es considerado como el valor a partir del cual podríamos empezar a suponer que dos colores son lo suficiente similares entre sí, ni si quiera se acerca al valor de 5 como sí sucedía en la tónica marca Original. Por debajo de este valor, el ojo humano no es capaz de apreciar la diferencia de color. El valor más próximo a 5 alcanzado y que se considera bastante alejado ha sido de $\Delta E^*ab = 11,34$, cuando se ha añadido un volumen de B-PE liofilizada de 95 μL . Se puede apreciar que la tonalidad del colorante antiocianinas que han usado para conseguir la tónica Schweppes Pink es muy diferente a la tonalidad de color que nos ofrece el colorante B-PE liofilizada, uno es más rosa anaranjado y otro es más rosa tirando a violeta ([Imagen 4.7](#)).

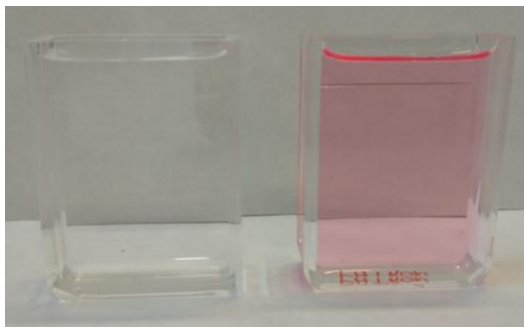
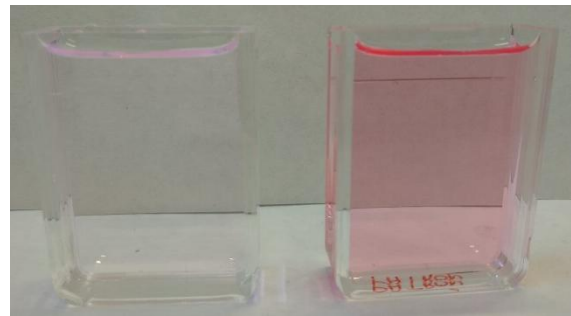
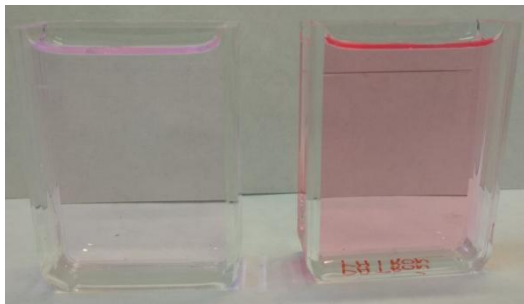


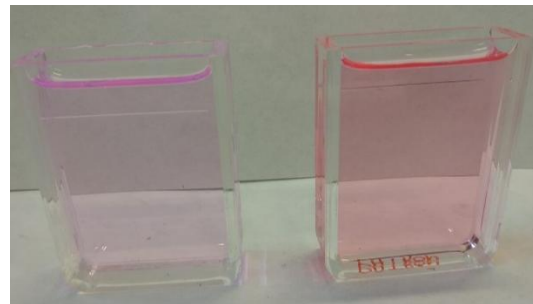
FOTO INICIAL ($\Delta E^*ab = 20,36$)



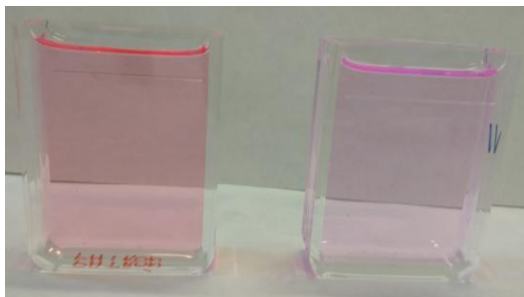
20 μ L ($\Delta E^*ab = 16,78$)



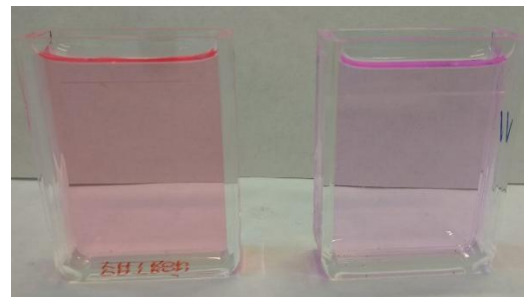
30 μ L ($\Delta E^*ab = 15,44$)



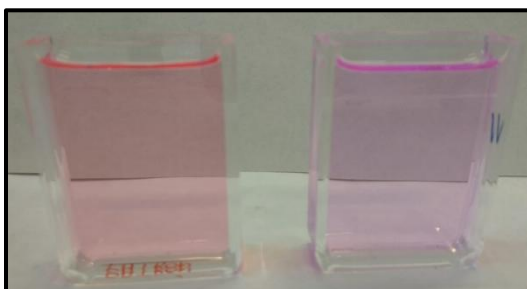
65 μ L ($\Delta E^*ab = 12,32$)



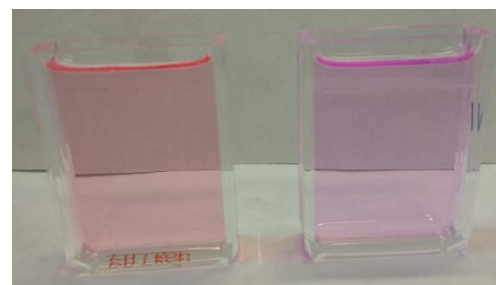
75 μ L ($\Delta E^*ab = 11,77$)



85 μ L ($\Delta E^*ab = 11,51$)



95 μ L ($\Delta E^*ab = 11,34$)



110 μ L ($\Delta E^*ab = 11,5$)

Imagen 4.7. Evolución del aspecto de las cubetas durante el ensayo de colorimetría en Tónica Schweppes con B-PE liofilizada

Seguidamente tras este ensayo se ha calculado el factor de tinción siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.2. Cálculo de los factores de tinción. [\(Tabla 4.19\).](#)

Tabla 4.19. Factor de tinción ensayo bebida tónica Schweppes con el colorante natural B-PE liofilizada

Bebida	Concentración B-PE liofilizada	Volumen B-PE liofilizada $\Delta E^*ab \approx 5$	FACTOR DE TINCIÓN (mg/mL)	FACTOR DE TINCIÓN (mg/L)
Tónica marca Schweppes	1,766 mg/mL	95 μ L	0,011929	11,929

Por último, se ha realizado el ensayo de acercamiento a un color atractivo comercialmente hablando, donde buscamos un color más intenso al comercial, un color más llamativo al ojo humano. A la cubeta con los 14 mL de tónica Schweppes incolora, le vamos añadiendo con ayuda de micropipetas diferentes volúmenes de nuestro colorante B-PE liofilizada de concentración 1,77 mg/mL hasta llegar a un color atractivo a la vista para su venta. Cada adición de B-PE liofilizada llevará asociada una medida en el colorímetro (respecto a la cubeta patrón con tónica Schweppes incolora) y una foto de la cubeta para ir viendo la evolución visual del color [\(Imagen 4.8\)](#). A partir de este ensayo, se ha conseguido elaborar la [Figura 4.17](#).

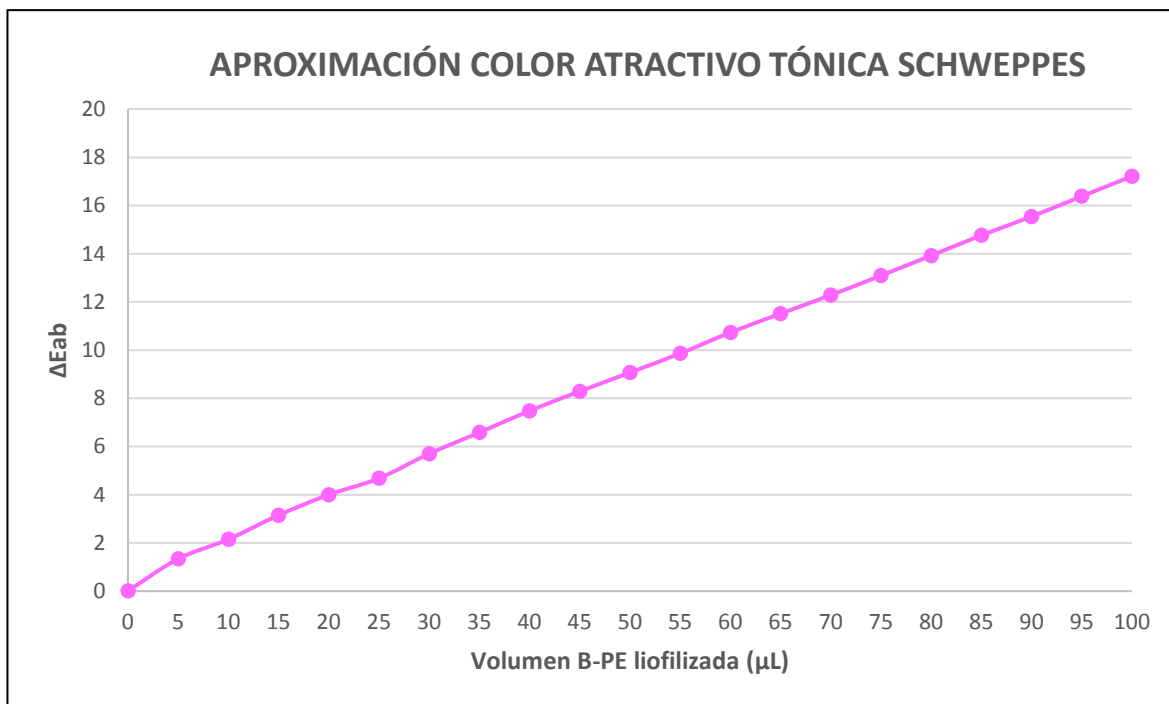


Figura 4.17. Ensayo aproximación al color atractivo bebida tónica marca Schweppes

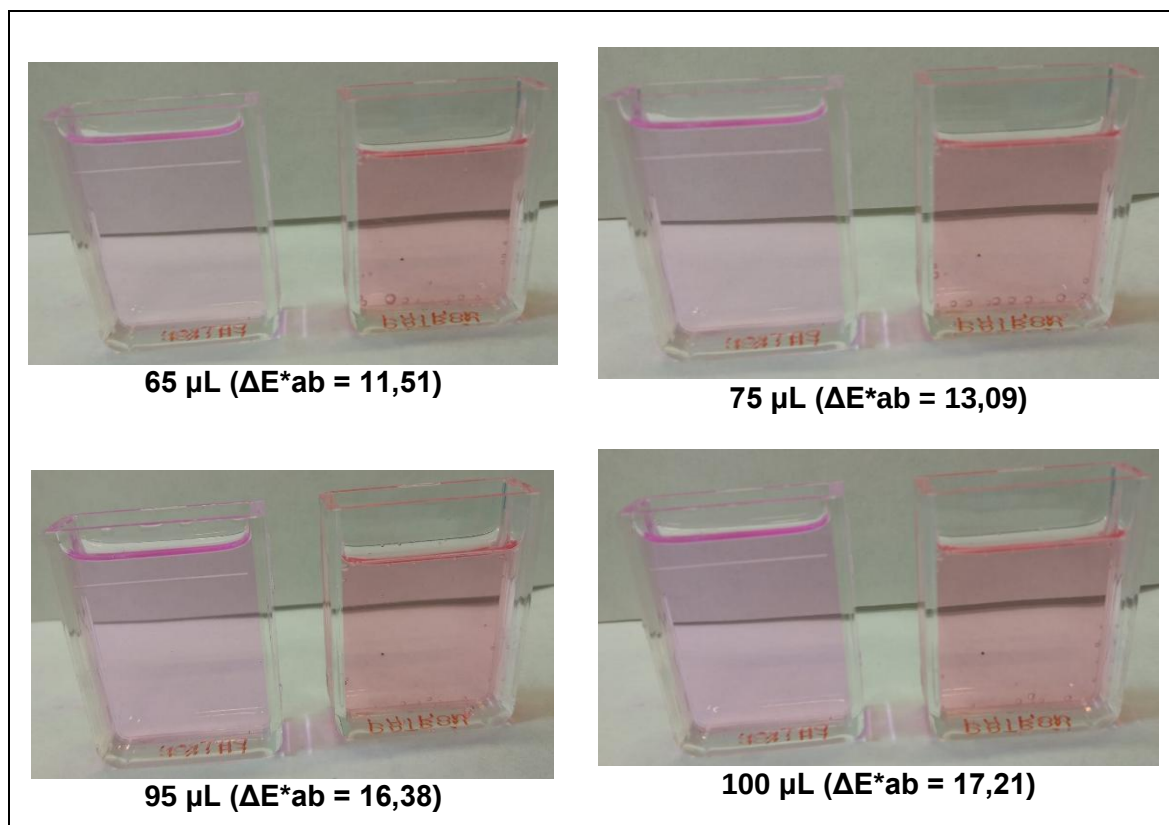


Imagen 4.8. Evolución del aspecto de las cubetas durante el ensayo de aproximación al color atractivo en Tónica Schweppes con B-PE liofilizada

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en esta Memoria se pueden extraer las siguientes discusiones y conclusiones:

- En relación al apartado 4.1. Caracterización de B-ficoeritrina (B-PE) liofilizada:

Podemos observar que en el espectro mostrado en la [Figura 4.1](#), el máximo de 544 nm se corresponde a la biliproteína B-ficoeritrina (B-PE) ya que absorbe a esa longitud de onda.

En la [Figura 4.3](#) se ha obtenido la Ley de Lambert-Beer para la muestra B-PE liofilizada con la siguiente ecuación:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c = 3,22 \cdot 10^6 \cdot 1 \cdot [B - PE] \quad \text{Ecuación (4.3)}$$

donde el coeficiente de extinción molar obtenido para la muestra **B-PE liofilizada (544 nm)** utilizada en esta Memoria tiene un valor de $3,22 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, siendo este superior al valor de **B-PE pura (545 nm)** utilizado en una tesis doctoral (Ruiz Ortega, 2012) con valor de $2,41 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Esta diferencia se podría justificar teniendo en cuenta que la estructura de la B-PE liofilizada es diferente a la de B-PE pura sin liofilizar.

En la [Figura 4.5](#) se ha obtenido la Ley de Kavanagh para la muestra B-PE liofilizada con la siguiente ecuación:

$$F = k \cdot c = 373,86 \cdot 10^7 \cdot [B - PE] \quad \text{Ecuación (4.4)}$$

donde la constante de Kavanagh obtenida para la muestra **B-PE liofilizada (573 nm)** utilizada en esta Memoria tiene un valor de $373,86 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, siendo este inferior al valor de **B-PE pura (576 nm)** utilizado en una tesis doctoral (Ruiz Ortega, 2012) con valor de $527,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Análogamente, estas diferencias pueden deberse al cambio en la estructura que sufre la proteína tras el proceso de liofilización.

- En relación al apartado 4.2. Caracterización B-PE extracto:

Podemos observar que en el espectro mostrado en la [Figura 4.6](#), el máximo de 543 nm se corresponde a la biliproteína B-ficoeritrina (B-PE) ya que absorbe a esa longitud de onda.

En la [Figura 4.8](#) se ha obtenido la Ley de Lambert-Beer para la muestra B-PE extracto con la siguiente ecuación:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c = 3,28 \cdot 10^6 \cdot 1 \cdot [B - PE] \quad \text{Ecuación (4.5)}$$

donde el coeficiente de extinción molar obtenido para la muestra **B-PE extracto (543 nm)** utilizada en esta Memoria tiene un valor de $3,28 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, siendo este superior al valor de **B-PE pura (545 nm)** utilizado en una tesis doctoral (Ruiz Ortega, 2012) con valor de $2,41 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Esta diferencia se podría justificar teniendo en cuenta que la estructura de la B-PE extracto es diferente a la de B-PE pura.

En la [Figura 4.10](#) se ha obtenido la Ley de Kavanagh para la muestra B-PE extracto con la siguiente ecuación:

$$F = k \cdot c = 330,41 \cdot 10^7 \cdot [B - PE] \quad \text{Ecuación (4.6)}$$

donde la constante de Kavanagh obtenida para la muestra **B-PE extracto (573 nm)** utilizada en esta Memoria tiene un valor de $330,41 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, siendo este inferior al valor de **B-PE pura (576 nm)** utilizado en una tesis doctoral (Ruiz Ortega, 2012) con valor de $527,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Análogamente, estas diferencias pueden deberse al cambio en la estructura que debe poseer la proteína en nuestro extracto frente a la proteína pura.

- En relación al apartado 4.3. Estabilidad del colorante natural B-PE liofilizada a diferentes pH:

De la observación de la [Imagen 4.2](#) y las Figuras [4.11](#) y [4.12](#), se puede concluir que cuando el valor del pH está comprendido en el intervalo 6-8, la B-ficoeritrina (B-PE) presenta sus propiedades espectroscópicas (absorción y fluorescencia) óptimas. Sin embargo, para valores de pH por debajo y por encima de este intervalo la B-PE va perdiendo gradualmente su color rosa característico debido a la desnaturalización de dicha proteína a ciertos valores de pH.

- En relación al apartado 4.4.1. Obtención de bebidas tónicas con el colorante B-PE liofilizada:

En la [Figura 4.14](#) se muestra que por adición del colorante natural B-PE liofilizada puede generarse una bebida tónica muy similar a la tónica comercial Original ($\Delta E^*_{ab} = 5,70$). Esto implicaría que podría sustituirse el colorante sintético Rojo Allura AC (E129) por el colorante natural B-PE liofilizada. Así, el factor de tinción de B-PE liofilizada en bebida tónica Original que se ha obtenido es de 3,78 mg/mL.

Por otro lado, se puede obtener una disolución de tónica con un color más intenso añadiendo para ello mayor cantidad de B-PE liofilizada hasta obtener una tonalidad acorde al gusto de los consumidores ([Imagen 4.5](#)).

- En relación al apartado 4.4.2. Obtención de bebidas tónicas con el colorante B-PE liofilizada:

En este experimento no se ha conseguido un color tan próximo al de la muestra comercial tónica Schweppes debido a que el color original de la misma es anaranjado frente al color rosáceo que genera el colorante natural B-PE liofilizada. Así se obtiene un mínimo valor de ΔE^*_{ab} de 11,34 muy superior al obtenido anteriormente con la tónica Original de 5,70.

No obstante, el color obtenido por adición del colorante de B-PE liofilizada sobre la Schweppes incolora puede resultar también atractivo para el consumidor.

Conclusión final:

B-ficoeritrina liofilizada y en formato extracto (disolución), puede ser una buena alternativa en la industria agroalimentaria para sustituir colorantes de naturaleza sintética por compuestos de origen natural, ampliando de esta forma el catálogo de colorantes actualmente existente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Arad, S. (Malis), & Yaron, A. (1992). Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends in Food Science & Technology*, 3, 92–97. [http://doi.org/10.1016/0924-2244\(92\)90145-M](http://doi.org/10.1016/0924-2244(92)90145-M)
- Acién Fernández, F.G., García Camacho, F., Sánchez Pérez, J.A., Fernández Sevilla, J. & Molina Grima, E. (1998). Modelling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(6), 605-616.
- Allen, M.B., Dougherty, E.C. & McLaughlin, J.J.A. (1959). *Nature*, 184, 1047-1049.
- Arad, S. & Yaron, A. (1992). *Trends in Food Science and Technology*, 3, 92.
- Aráoz, R., Lebert, M. & Häder, D.P. (1998). *Electrophoresis*, 19, 215-219.
- Ayyagari, M.S., Pande, R., Kanstekar, S., Gao, H., Marx, K.A., Kumar, J., Tripathy, S.K., Akkara, J.A. & Kaplan, D.L. (1995). *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 116-121.

B

- Bermejo, R. (2009). *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 239, 41-45.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Blinkova, L.P., Gorobets, O.B. & Baturo, A.P. (2001). Biological activity of Spirulina. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 2, 114-8.
- Berns, D.S & Scott, E. (1966). *Biochemistry*, 5, 1528-1533.
- Berns, D.S. & Morgenstem, A. (1968). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 123, 640-642.
- Bermejo, R. (2008). *Énfasis Alimentación*, 1, 64-68.
- Bermejo, R. (2009). *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 239, 41-45.
- Bermejo, R., Talavera, E.M., del Valle, C. & Álvarez-Pez, J.M. (2000). *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 18, 51-59.
- Bermejo, R., Tobaruela, D., Talavera, E.M., Orte, A. & Álvarez-Pez, J.M. (2003). *Journal of Colloid and Interface Science*, 263, 616-624.

- Batard, P., Szollosi, J., Luescher, 1. Cerottini, J.C., MacDonald, R. & Romero, P. (2002). *Cytometry*, 48, 97-105.
- Bermejo, R., Álvarez-Pez, J.M., Acién-Fernández, F.G. & Molina, E. (2002). *Journal of Biotechnology*, 93, 73-85.
- Benedetti, S., Rinalducci, S., Benvenuti, F., Francogli, S., Pagliarani, S., Giorgi, L., Micheloni, M. & Canestrari, F. (2006). *Journal of Chromatography B*, 833, 12-18.
- Bhat. V.B. & Madyastha, K.M. (2000). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275, 20-25.

C

- Cole, K.M. & Sneath, R.G. (Eds.). (1990). En: "Biology of the Red Algae". Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Chaumont, D. (1993). *Journal of Applied Phycology*, 5, 593-604.

D

- Dasgupta, C. N. (2015). *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*. Debabatra. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6>
- Delgado-Vargas F. y Paredes-López O. (2003). Natural colorants for food and nutraceutical uses. En: CRC Press.
- Durand-Chastel, H. (1980). Production and use of *Spirulina in Mexico*. In: Shele G, Soeder CJ, editor. *Algae Biomass*. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical; 51–64.
- Dermoun, D., Chaumont, D., Thebault, J-M. & Dauta, A. (1992). *Bioresource Technology*, 42, 113-117.
- Dainnipon InK y Chemicals Inc. (1979). Jpn Pat., 95770.
- Dainnipon InK y Chemicals Inc. (1987). Jpn Pat., 06691.

F

- Francis, F.J. (1995). *Food Quality and Preference*, 6, 149-155.
- Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P. & Walsby, A.E. (1973). En: "The Blue-Green Algae". Academic Press, London.

G

- González-Ramírez, E., Andújar-Sánchez, M., Ortiz-Salmerón, E., Bacarizo, J., Cuadri, C., Mazzuca-Sobczuk, T., Ibáñez, M.J., Cámara-Artigas, A. & Martínez-Rodríguez, S. (2014). Thermal and pH Stability of the B-Phycoerythrin from the Red Algae *Porphyridium cruentum*. *Food Biophysics*, 9, 184–192. <http://doi.org/10.1007/s11483-014-9331-x>
- Guerrero, M.G. & Losada, M. (1989). Producción fotosintética de compuestos de interés práctico por microalgas. En: "Fotosíntesis". Colección Nuevas Tendencias, CSIC, Madrid.
- Glazer, A.N., West, J.I. & Chan, C. (1982). *Biochemical Systematic and Ecology*, 10, 203-215.
- Gantt, E. (1979). Phycobiliproteins of cryptophyceae. En: "Biochemistry and Physiology of Protozoa". (M. Levandowsky, y S.H. Huttner, eds.). Academic Press, New York, Vol. 1, pp. 121-137.
- Gantt, E. (1980). *International Review of Cytology*, 66, 45-80.
- Glazer, A.N. y Wedemayer, G.J. (1995). *Photosynthesis Research*, 46, 93-105.
- Glazer, A.N. (1976). En: "The biliproteins". (N. Neurath y R.L. Hill, eds.). Academic Press, New York, Vol. 11, pp. 1-103.
- Glazer, A.N. (1981). Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. En: "The biochemistry of Plants". (M.D. Hatch, y N.K. Boardman, eds.). Academic Press, New York, Vol. 8, pp. 51-96.
- Glazer, A.N., (1984). *Biochimica et Biophysica Acta*, 768, 29-51.
- Glazer, A.N. (1985). *Annual Review Biophysics and Biophysical Chemistry*, 14, 47-77.
- Glazer, A.N. (1986). Microbial Energy Transduction, Genetics, Structure and Function of Membrane Proteins. En: "Current Communications in Molecular Biology". (D.C. Daldal y F. Daldal, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 31-36.
- Glazer, A.N. (1989). *Journal of Biological Chemistry*, 264, 1-4.
- Glazer, A.N. & Stryer, L. (1984). *Trends in Biochemical Science*, 9, 423-427.
- González, R., Rodríguez, S., Romay, C., González, A., Armesto, J., Ramirez, D. y Merino, N. (1999). *Pharmacological Research*, 39, 55-59.

H

- Honsell, E., Kosovel, V. & Talarico, L. (1984). *Botánica Marina*, 27, 1-16.
- Haxo, F.T. & Fork, D.C. (1959). *Nature*, 184, 1051-1052.

- Huang, B., Wang, G.C., Zeng, C.K. & Li, Z.G. (2002). *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 17, 35-42.

J

- Jespersen, L., Strømdahl, L. D., Olsen, K., & Skibsted, L. H. (2004). Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology*, 220, 261–266.
<http://doi.org/10.1007/s00217-004-1062-7>

K

- Konica Minolta (2007), Precise color communication, 9242-4830-92, <http://konicaminolta.com/instruments/about/network>.
- Klausner, A. (1986). *Biotechnology*, 4, 947-953.
- Kronick, M.N. & Grossman, P.D. (1983). *Clinical Chemistry*, 29, 1582-1586.
- Koho, K.Y. (1982). Jpn Pat, 58, 128, 322, [83, 128.322], pp. 5.

L

- *La importancia del uso de colorantes naturales*. (2017, 30 agosto). Farbe. <https://www.farbe.com.mx/la-importancia-del-uso-de-colorantes-naturales/>
- Lemberg, R. & Legge, J.W. (1949). En: "Hematin Compounds and Bile Pigments". Interscience Publishers, New York.
- Lee, E.T. & Bazin, M.J. (1990). *New Phytologist*, 116, 331-335.

M

- Mendiola, J.A., Jaime, L., Santoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibáñez, E., & Señoráns, F.J. (2007). Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina Platensis*. *Food Chemistry*, 102(4), 1357-1367.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.068>
- MacColl, R., Lee, L.J. & Berns, D.S. (1971). *Biochemistry Journal*, 122, 421-426.
- Mörschel, E. y Rhiel, E. (1987). Phycobilisomes and thylakoids: the light-harvesting system of cyanobacteria and red algae. In: "Membrane Structures". (J.R. Harris y R.W. Horne, eds.). Academic Press, New York, USA pp. 209-254.
- Myers, J. & Kratz, W.A. (1955). *Journal of General Physiology*, 39, 11-22.

- Mihova, S.G., Georgiev, D.I., Minkova, K.M. & Tchernov, A.A. (1996). *Journal of Biotechnology*, 48, 251-257.
- MacColl, R. y Guard-Friar, D. (1987). In: "Phycobiliproteins". CRC Press, Boca Raton, Florida.

O

- Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the Marketplace. *Biomolecular Engineering*. 20, 459-466.

P

- Pulz O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57(3), 287-293.
<https://doi.org/10.1007/s002530100702>
- Parkinson, G. (1987). *Chemical Engineering*, 94, 19-22.

R

- REGLAMENTO (CE) Nº 1333/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO del 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios.
- Ruiz-Ruiz, F., Benavides, J., & Rito-Palomares, M. (2013). Scaling-up of a Bphycoerythrin production and purification bioprocess involving aqueous two-phase systems: Practical experiences. *Process Biochemistry*, 48(4), 738–745.
<http://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.010>
- Ruiz Ortega, E. (2012). *Obtención y purificación de ficoeritrina mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido. escalado del proceso, caracterización fisicoquímica y aplicación como colorante natural*. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén.
- Reboloso Fuentes, M.M., Acién Fernández, G.G., Sánchez Pérez, J.A. & Guill-Guerrero, J-L. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. 70(3), 345-353.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Ashok Kumar, N., Sridhar, S. & Rengasamy, R. (2008). A Perspective of Biotechnological Potential of Microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*. 34(2), 77-88.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Stainer, R.Y. (1979). *Journal of General Microbiology*, 111, 1-61.

- Rippka, R. (1988). *Methods in Enzymology*, 167, 28-67.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Stanier, R.Y. (1979). *Journal of General Microbiology*, 111, 1-61.
- Remirez, D., González, A., Merino, N., González R., Ancheta, O., Romay, C. & Rodríguez, S. (1999). *Drug Development Research*, 48, 70-75.
- Romay, C., Ledón, N. & González, R. (1999). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 641-642.
- Romay, C. & González, R. (2000). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52, 367-368.

S

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Scott, E. & Berns, D.S. (1965). *Biochemistry*, 4, 2597-2606.
- Saxena, A.M. (1988). *Journal of Molecular Biology*, 200, 579-591.
- Stainer, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. (1971). *Bacteriological Reviews*, 35, 171-205.
- Sun, L., Wang, S., Chen, L. & Gong, X. (2003). *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*, 9, 177-188.

V

- Verma, J.P., Yadav, J., Tiwari, K. & Lavakush, Singh, V. (2010). Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Crop Production. *International Journal of Agricultural Research*, 5(11), 954-983. <http://dx.doi.org/10.3923/ijar.2010.954.983>

W

- Weesepeel, Y., Gruppen, H., & Vincken, J.-P. (2015). Preliminary UHPLC-PDA-ESI-MS screening of light-accelerated autoxidation products of the tetrapyrrole biliverdin. *Food Chemistry*, 173, 624–628. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.072>
- Wrolstad, R.E., Acree, T.E., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D. & Sporns, P. (2005). *Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Component*. John Wiley & Sons, Inc.

- Wedemayer, G.J., Kidd, D.G. & Glazer, A.N. (1996). *Photosynthesis Research*, 48, 163-170.

Z

- Zola, H., Flego, L. & Sheldon, A. (1992). *Inmunobiology*, 185, 350-365.

ANEXO I: Obtención de bebida tónica Original con el colorante B-PE liofilizada y Aproximación color atractivo

ANEXO I: OBTENCIÓN DE BEBIDA TÓNICA ORIGINAL CON EL COLORANTE B-PE LIOFILIZADA Y APROXIMACIÓN COLOR ATRACTIVO

Tabla 4.20. Ensayo curva color tónica Original con B-PE liofilizada

	Nombre datos	Patrón núm.	L* (D65)	a* (D65)	b* (D65)	dL* (D65)	da* (D65)	db* (D65)	dE*ab (D65)	Volumen B-PE liofilizada (µL)
Patrón	TÓNICA ORIGINAL ROSA PATRÓN (03/03/2020 10:15:03)	-----	96,41	8,64	0,39	-----	-----	-----	-----	-----
1	TONICA ORIGINAL INCOLORA (0) (03/03/2020 10:18:20)	1	100,0 9	-0,1	-0,11	3,68	-8,75	-0,5	9,5	0
2	TONICA ORIGINAL INCOLORA (5) (03/03/2020 10:53:30)	1	99,61	0,77	-0,76	3,2	-7,88	-1,16	8,58	5
3	TONICA ORIGINAL INCOLORA (10) (03/03/2020 10:58:49)	1	99,14	1,61	-1,37	2,74	-7,03	-1,77	7,75	10
4	TONICA ORIGINAL INCOLORA (15) (03/03/2020 11:37:12)	1	98,72	2,32	-1,94	2,31	-6,33	-2,33	7,13	15
5	TONICA ORIGINAL INCOLORA (20) (03/03/2020 11:39:03)	1	98,23	3,21	-2,59	1,82	-5,43	-2,98	6,46	20
6	TONICA ORIGINAL INCOLORA (25) (03/03/2020 11:42:55)	1	97,72	4,09	-3,26	1,32	-4,55	-3,65	5,98	25
7	TONICA ORIGINAL INCOLORA (30) (03/03/2020 11:45:24)	1	97,21	5,02	-3,94	0,8	-3,62	-4,33	5,7	30
8	TONICA ORIGINAL INCOLORA (35) (03/03/2020 11:47:30)	1	96,68	5,97	-4,64	0,27	-2,68	-5,03	5,71	35
9	TONICA ORIGINAL INCOLORA (40) (03/03/2020 11:52:27)	1	96,09	6,91	-5,37	-0,31	-1,74	-5,76	6,03	40
10	TONICA ORIGINAL INCOLORA (45) (03/03/2020 11:55:26)	1	95,65	7,68	-5,95	-0,75	-0,96	-6,34	6,46	45
11	TONICA ORIGINAL INCOLORA (50) (03/03/2020 11:57:03)	1	95,19	8,53	-6,55	-1,21	-0,11	-6,94	7,05	50

Tabla 4.21. Ensayo aproximación color atractivo tónica Original con B-PE liofilizada

	Nombre datos	Patrón núm.	L* (D65)	a* (D65)	b* (D65)	dL* (D65)	da* (D65)	db* (D65)	dE*ab (D65)	Volumen B-PE liofilizada (µL)
Patrón	TÓNICA ORIGINAL INCOLORA (12/03/2020 12:48:51)	-----	101,05	-0,16	-0,46	-----	-----	-----	-----	-----
1	TONICA ORIGINAL INCOLORA (5) (12/03/2020 12:58:53)	1	100,49	0,92	-1,24	-0,56	1,08	-0,78	1,45	5
2	TONICA ORIGINAL INCOLORA (10) (12/03/2020 13:00:38)	1	99,85	2,07	-2,07	-1,21	2,23	-1,62	3	10
3	TONICA ORIGINAL INCOLORA (15) (12/03/2020 13:03:10)	1	99,35	2,94	-2,73	-1,7	3,1	-2,27	4,21	15
4	TONICA ORIGINAL INCOLORA (20) (12/03/2020 13:06:11)	1	98,77	3,97	-3,51	-2,28	4,13	-3,05	5,62	20
5	TONICA ORIGINAL INCOLORA (25) (12/03/2020 13:08:34)	1	98,16	5,11	-4,33	-2,89	5,27	-3,87	7,15	25
6	TONICA ORIGINAL INCOLORA (30) (12/03/2020 13:12:37)	1	97,67	5,86	-4,92	-3,38	6,02	-4,47	8,22	30
7	TONICA ORIGINAL INCOLORA (35) (12/03/2020 13:17:35)	1	97,3	6,62	-5,53	-3,75	6,78	-5,07	9,26	35
8	TONICA ORIGINAL INCOLORA (40) (12/03/2020 13:19:08)	1	96,79	7,55	-6,2	-4,26	7,72	-5,75	10,52	40
9	TONICA ORIGINAL INCOLORA (45) (12/03/2020 13:21:31)	1	96,28	8,43	-6,85	-4,77	8,59	-6,4	11,72	45
10	TONICA ORIGINAL INCOLORA (50) (12/03/2020 13:24:08)	1	95,82	9,19	-7,4	-5,23	9,35	-6,95	12,76	50
11	TONICA ORIGINAL INCOLORA (55) (12/03/2020 13:26:07)	1	95,34	10,04	-8,06	-5,71	10,21	-7,61	13,95	55
12	TONICA ORIGINAL INCOLORA (60) (12/03/2020 13:28:12)	1	94,85	10,88	-8,66	-6,2	11,04	-8,2	15,09	60
13	TONICA ORIGINAL INCOLORA (65) (12/03/2020 13:30:35)	1	94,27	11,92	-9,4	-6,78	12,08	-8,94	16,49	65
14	TONICA ORIGINAL INCOLORA (70) (12/03/2020 13:42:21)	1	93,92	12,23	-9,8	-7,13	12,39	-9,34	17,07	70

15	TONICA ORIGINAL INCOLORA (75) (12/03/2020 13:45:55)	1	93,43	13,07	-10,42	-7,62	13,23	-9,96	18,23	75
16	TONICA ORIGINAL INCOLORA (80) (12/03/2020 13:47:51)	1	92,85	14,15	-11,15	-8,2	14,31	-10,69	19,66	80
17	TONICA ORIGINAL INCOLORA (85) (12/03/2020 13:49:22)	1	92,37	15,05	-11,77	-8,69	15,21	-11,31	20,85	85
18	TONICA ORIGINAL INCOLORA (90) (12/03/2020 13:52:15)	1	91,95	15,74	-12,3	-9,1	15,9	-11,85	21,82	90
19	TONICA ORIGINAL INCOLORA (95) (12/03/2020 13:55:36)	1	91,5	16,52	-12,89	-9,56	16,68	-12,43	22,89	95
20	TONICA ORIGINAL INCOLORA (100) (12/03/2020 13:59:34)	1	91,06	17,23	-13,43	-10	17,4	-12,97	23,89	100

ANEXO II: Obtención de bebida tónica Schweppes con el colorante B-PE liofilizada y Aproximación color atractivo

ANEXO II: OBTENCIÓN DE BEBIDA TÓNICA SCHWEPPEES CON EL COLORANTE B-PE LIOFILIZADA Y APROXIMACIÓN COLOR ATRACTIVO

Tabla 4.22. Ensayo curva color tónica Schweppes con B-PE liofilizada

Nombre datos		Patrón núm.	L* (D65)	a* (D65)	b* (D65)	dL* (D65)	da* (D65)	db* (D65)	dE*ab (D65)	Volumen B-PE liofilizada (µL)
Patrón	TÓNICA SCHWEPPEES PINK (13/03/2020 11:48:27)	-----	91,02	18,16	-0,42	-----	-----	-----	-----	-----
1	TÓNICA SCHWEPPEES BLANCA (13/03/2020 11:54:39)	1	100,15	-0,05	-0,36	9,12	-18,21	0,06	20,36	0
2	TÓNICA SCHWEPPEES INCOLORA (5) (13/03/2020 12:02:38)	1	99,57	0,96	-1,15	8,55	-17,2	-0,73	19,22	5
3	TÓNICA SCHWEPPEES INCOLORA (10) (13/03/2020 12:04:43)	1	99,1	1,78	-1,79	8,08	-16,37	-1,37	18,31	10
4	TÓNICA SCHWEPPEES INCOLORA (15) (13/03/2020 12:06:52)	1	98,6	2,62	-2,45	7,58	-15,53	-2,03	17,4	15
5	TÓNICA SCHWEPPEES INCOLORA (20) (13/03/2020 12:08:37)	1	98,25	3,22	-2,92	7,22	-14,94	-2,5	16,78	20
6	TÓNICA SCHWEPPEES INCOLORA (25) (13/03/2020 12:11:09)	1	97,82	3,92	-3,47	6,8	-14,24	-3,05	16,07	25
7	TÓNICA SCHWEPPEES INCOLORA (30) (13/03/2020 12:12:43)	1	97,44	4,58	-4	6,41	-13,58	-3,58	15,44	30
8	TÓNICA SCHWEPPEES INCOLORA (35) (13/03/2020 12:14:30)	1	97,08	5,17	-4,46	6,06	-12,99	-4,04	14,89	35
9	TÓNICA SCHWEPPEES INCOLORA (40) (13/03/2020 12:15:49)	1	96,7	5,81	-4,95	5,67	-12,34	-4,53	14,32	40
10	TÓNICA SCHWEPPEES INCOLORA (45) (13/03/2020 12:24:11)	1	96,41	6,2	-5,32	5,38	-11,96	-4,9	14	45
11	TÓNICA SCHWEPPEES INCOLORA (55) (13/03/2020 12:26:34)	1	95,71	7,45	-6,23	4,68	-10,71	-5,81	13,06	55

12	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (65) (13/03/2020 12:27:42)	1	95,03	8,61	-7,1	4,01	-9,55	-6,68	12,32	65
13	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (75) (13/03/2020 12:29:32)	1	94,35	9,8	-8,01	3,33	-8,36	-7,59	11,77	75
14	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (85) (13/03/2020 12:32:36)	1	93,83	10,65	-8,69	2,81	-7,51	-8,27	11,51	85
15	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (95) (13/03/2020 12:34:24)	1	93,17	11,77	-9,54	2,15	-6,39	-9,12	11,34	95
16	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (105) (13/03/2020 12:35:54)	1	92,49	12,99	-10,44	1,47	-5,17	-10,02	11,37	105
17	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (110) (13/03/2020 12:38:22)	1	92,17	13,48	-10,86	1,14	-4,67	-10,44	11,5	110

Tabla 4.23. Ensayo aproximación color atractivo tónica Schweppes con B-PE liofilizada

	Nombre datos	Patrón núm.	L* (D65)	a* (D65)	b* (D65)	dL* (D65)	da* (D65)	db* (D65)	dE*ab (D65)	Volumen B-PE liofilizada (µL)
Patrón	TÓNICA SCHWEPES INCOLORA CURVA COLOR ATTRACT(13/03/2020 13:00:31)	-----	100,1	-0,04	-0,29	-----	-----	-----	-----	-----
1	TÓNICA SCHWEPES INCOLORA (0) (13/03/2020 13:02:37)	2	100,11	-0,04	-0,3	0	0	0	0,01	0
2	TÓNICA SCHWEPES INCOLORA (5) (13/03/2020 13:04:14)	2	99,56	0,94	-1,03	-0,55	0,98	-0,74	1,34	5
3	TÓNICA SCHWEPES INCOLORA (10) (13/03/2020 13:05:57)	2	99,21	1,51	-1,49	-0,89	1,55	-1,2	2,15	10
4	TÓNICA SCHWEPES INCOLORA (15) (13/03/2020 13:07:37)	2	98,79	2,22	-2,05	-1,32	2,26	-1,75	3,15	15
5	TÓNICA SCHWEPES INCOLORA (20) (13/03/2020 13:08:56)	2	98,43	2,82	-2,53	-1,67	2,86	-2,23	4	20
6	TÓNICA SCHWEPES INCOLORA (25) (13/03/2020 13:10:14)	2	98,14	3,3	-2,92	-1,96	3,34	-2,62	4,68	25
7	TÓNICA SCHWEPES INCOLORA (30) (13/03/2020 13:15:40)	2	97,7	4,02	-3,49	-2,41	4,06	-3,2	5,7	30
8	TÓNICA SCHWEPES INCOLORA (35) (13/03/2020 13:18:09)	2	97,32	4,65	-3,99	-2,78	4,69	-3,69	6,58	35
9	TÓNICA SCHWEPES INCOLORA (40) (13/03/2020 13:19:15)	2	96,94	5,3	-4,48	-3,16	5,34	-4,18	7,48	40
10	TÓNICA SCHWEPES INCOLORA (45) (13/03/2020 13:20:39)	2	96,6	5,86	-4,94	-3,5	5,9	-4,64	8,29	45
11	TÓNICA SCHWEPES INCOLORA (50) (13/03/2020 13:22:39)	2	96,26	6,41	-5,38	-3,84	6,45	-5,08	9,07	50
12	TÓNICA SCHWEPES INCOLORA (55) (13/03/2020 13:24:22)	2	95,92	6,97	-5,82	-4,19	7,01	-5,52	9,86	55

13	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (60) (13/03/2020 13:26:10)	2	95,55	7,6	-6,3	-4,55	7,64	-6,01	10,73	60
14	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (65) (13/03/2020 13:27:43)	2	95,22	8,16	-6,74	-4,89	8,2	-6,44	11,51	65
15	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (70) (13/03/2020 13:29:31)	2	94,89	8,7	-7,16	-5,22	8,74	-6,87	12,28	70
16	TÓNICA SCHWEPPE BINCOLORA (75) (13/03/2020 13:31:13)	2	94,55	9,28	-7,61	-5,56	9,32	-7,31	13,09	75
17	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (80) (13/03/2020 13:32:26)	2	94,19	9,88	-8,06	-5,91	9,92	-7,76	13,92	80
18	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (85) (13/03/2020 13:33:23)	2	93,84	10,5	-8,51	-6,26	10,54	-8,22	14,76	85
19	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (90) (13/03/2020 13:34:47)	2	93,51	11,06	-8,95	-6,6	11,1	-8,65	15,54	90
20	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (95) (13/03/2020 13:36:15)	2	93,15	11,66	-9,41	-6,95	11,7	-9,12	16,38	95
21	TÓNICA SCHWEPPE INCOLORA (100) (13/03/2020 13:38:23)	2	92,78	12,24	-9,87	-7,32	12,28	-9,58	17,21	100