



Desarrollo de una bebida verde con espirulina (*Arthrospira* sp.) mediante el diseño experimental de mezclas*

Development of a green drink with spirulina (*Arthrospira* sp.) using the experimental mixture design

Fiorella Bolaños-Quirós¹, Pilar Fallas-Rodríguez², Laura Murillo-González¹, Ana M. Pérez², Ana M. Quirós^{1,2}

* Recepción: 21 de junio, 2024. Aceptación: 28 de agosto, 2024. Este trabajo formó parte de un proyecto financiado por la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica. Ejecutado como Trabajo Final de Graduación en la Sede de Guanacaste en el marco del proyecto 735-C0-455 Desarrollo de alimentos enriquecidos con biomasa de la cianobacteria *Arthrospira* (espirulina) que contengan compuestos bioactivos con beneficios potenciales para la salud humana.

¹ Universidad de Costa Rica, Carrera de Ingeniería de Alimentos, Sede de Guanacaste. Liberia, Costa Rica. fiobq22@gmail.com (<https://orcid.org/0009-0005-0346-9159>), laura.murillogonzalez@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0009-0003-6255-5079>), ana.quiros_b@ucr.ac.cr (autora para la correspondencia, <https://orcid.org/0000-0003-0240-5100>).

² Universidad de Costa Rica, Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica. pilar.fallasrodriguez@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-3606-6330>), ana.perez@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0003-0940-9796>).

Resumen

Introducción. Existe una tendencia al consumo de espirulina (*Arthrospira* sp.) por su valor nutricional y como fuente de proteína sostenible. La espirulina cuenta con sabor y olor intenso que puede generar desagrado a los consumidores, por lo que es conveniente el uso del diseño experimental de mezclas para la optimización de la formulación. **Objetivo.** Desarrollar un prototipo de bebida verde con alto valor nutricional con espirulina como ingrediente, mediante la aplicación de un diseño experimental de mezclas. **Materiales y métodos.** La investigación se llevó a cabo en la Universidad de Costa Rica sede Liberia, Guanacaste, entre julio y diciembre del 2022. Se elaboraron once prototipos de bebida con espirulina y se aplicó el diseño de mezclas (llenado del espacio) con tres factores (espirulina, azúcar, frutas/vegetales) y el agrado general como variable de respuesta. El agrado fue evaluado en un panel con 95 consumidores y los promedios se ajustaron al modelo de polinomial de *Scheffe*. Se obtuvo la ecuación del modelo del software JMP16 y se verificó en un panel con veintisiete consumidores y cinco muestras. Se realizaron análisis fisicoquímicos para obtener el valor nutricional de un prototipo seleccionado de la bebida. **Resultados.** Se encontró un efecto de los factores sobre el agrado del producto ($p < 0,05$). Los valores de $R^2 = 0,97$ y $R^2\text{-adj} = 0,96$ demostraron que el modelo se ajusta a los datos experimentales. La validación confirmó que el modelo logra predecir el agrado general. Se caracterizó la formulación con un 2 % de espirulina y una porción de 300 mL, se declaró como bajo en sodio, fuente de proteína y magnesio, rica en hierro y vitamina C. **Conclusiones.** Se logró obtener un modelo matemático significativo y ajustado que logra predecir el agrado de una bebida con espirulina. El prototipo desarrollado contiene más espirulina y proteína que bebidas similares del mercado.

Palabras clave: proteínas de algas, innovación, análisis de alimentos, procesamiento de alimentos.



Abstract

Introduction. There is a tendency to consume spirulina (*Arthrospira* sp.) due to its nutritional value and potential as a sustainable protein source. Spirulina has an intense flavor and odor that can be disliked by consumers, so it is convenient to use the experimental design of mixtures to optimize the formulation. **Objective.** To develop a prototype of a green beverage prototype with high nutritional value that incorporates spirulina as an ingredient, through the application of an experimental mixture design. **Materials and methods.** The research was carried out at Universidad de Costa Rica, Liberia campus, in Guanacaste, between July and December 2022. Eleven prototypes of a spirulina-based beverage were prepared, and a space-filling mixture design was applied with three factors (spirulina, sugar, and fruits/vegetables) and overall acceptability as the response variable. Acceptability was evaluated by a panel of 95 consumers, with the averages adjusted using the Scheffe polynomial model. The model equation was obtained using JMP16 software and validated by a panel of 27 consumers with five samples. Physicochemical analyses were conducted to determine the nutritional value of a selected beverage prototype. **Results.** The factors were found to influence product acceptability ($p < 0.05$). The values of $R^2 = 0.97$ and adjusted $R^2 - \text{adj} = 0.96$ indicated that the model fits the experimental data. Validation confirmed that the model reliably predicts overall acceptability. The formulation, which contains 2 % spirulina and a 300 mL serving, was characterized as low in sodium, a source of protein and magnesium, and rich in iron and vitamin C. **Conclusions.** It was possible to obtain a significant and adjusted mathematical model that manages to predict the liking of a beverage with spirulina. The developed prototype contains more spirulina and protein than similar beverages on the market.

Keywords: algal proteins, innovation, food analysis, food processing.

Introducción

La espirulina (*Arthrospira* sp.) es una cianobacteria planctónica verde-azulada, también conocida como una microalga (Hernández-Lepe et al., 2015). Se ha observado una tendencia del consumo de espirulina en alimentos y suplementos, debido a sus propiedades nutricionales y potencial funcional (Gutiérrez-Salmeán et al., 2015). La espirulina contiene ficocianina, responsable de su coloración verde-azulada (Alfaro-Alfaro et al., 2020), la cual es un polipéptido parte de las ficobiliproteínas, a la que se le atribuyen actividades biológicas como propiedades antioxidantes antiinflamatorias, inmunorreguladoras, citoprotectoras y antitumorales (Marín-Prida et al., 2015).

Entre otros beneficios que se le atribuyen a la espirulina se encuentra la protección cardiovascular, debido a compuestos que disminuyen la incidencia de enfermedades asociadas a dislipemia y el estrés oxidativo (Hernández-Lepe et al., 2015; Ochoa Galarza & Moyano Calero, 2022). La espirulina presenta un atractivo nutricional por su alto contenido de proteína, cercano al 70 % en base seca, mayor que el de otras proteínas tradicionales como la soya (Malpartida et al., 2022; Vázquez Pérez et al., 2016). Esto la convierte en un ingrediente con potencial para ser utilizado como fuente de proteína alternativa a la proteína animal.

En Costa Rica existe interés en la producción de espirulina como fuente de proteína. Varias investigaciones se han llevado a cabo en la Universidad Nacional, el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC), el Instituto Tecnológico de Costa Rica, la Universidad de Costa Rica y el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBIOT) (Blanco, 2011; Umaña Venegas, 2019; Villalta-Romero et al., 2019). Los estudios demuestran que las condiciones climáticas de Costa Rica permiten la producción de microalgas como la espirulina, y que su producción puede ser una opción a futuro para generar trabajo e ingreso económico para poblaciones rurales costeras (Villalta-Romero et al., 2019).

El consumo de espirulina se ve limitado por sus atributos sensoriales, ya que el sabor de las microalgas puede resultar desagradable debido a sabores amargos o similares al agua de mar. Los alimentos con alto contenido de

ácidos grasos insaturados como la espirulina, se oxidan durante el procesamiento y se producen sabores extraños por la formación de aldehídos, cetonas y alcoholes que se fijan a proteínas (Gutiérrez Vergary & Tello Echeverría, 2018). Las coloraciones que se obtienen en alimentos con la adición de espirulina también pueden generar baja aceptabilidad, sobre todo cuando se aplican tratamientos térmicos (Böcker et al., 2019).

El desarrollo de productos con espirulina debe considerar la aceptación de los consumidores. Para ello, las técnicas de análisis sensorial y de optimización de formulación permiten determinar la combinación de ingredientes más aceptada (Di Giorgio & Pérez, 2023). Un ejemplo es el diseño experimental de mezclas, utilizado en la industria alimentaria para encontrar la zona óptima de agrado y disminuir el número de formulaciones evaluadas (Gómez Payán et al., 2015). En este diseño los factores dependen uno del otro y las proporciones suman una cantidad fija, ya sea 100 % o 1 (Buruk Sahin et al., 2016). La superficie de respuesta obtenida relaciona y predice el efecto de cualquier combinación de los factores o su influencia en la variable respuesta (Cabrera Castro, 2014).

Los batidos verdes son un tipo de bebida muy popular, que aportan fibra, carbohidratos, grasas saludables, proteína, enzimas, vitaminas, minerales y otros nutrientes como la clorofila (Lietzow et al., 2022). Algunas marcas de bebidas verdes que incorporan espirulina son: *B-Blue*[®], *Innocent*[®], *Press*[®], *Suja Organic*[®], *Naked*[®], *Flax & Kale*[®], *Foods by Ann*[®], *Nu Smoothie*[®], *Amazing Grass*[®], *Naturelo*[®], y *Solti*[®]. Es posible encontrar opciones con contenido de espirulina bajo, por ejemplo, la marca *Nu*[®] que contiene 0,06 % (Nu Smoothie, n.d.) e *Innocent Drinks*[®] 0,8 % (Innocent Drinks, n.d.) de extracto de espirulina.

La presente investigación tuvo como objetivo desarrollar un prototipo de bebida verde con alto valor nutricional con espirulina como ingrediente, mediante la aplicación de un diseño experimental de mezclas. La información generada podrá ser utilizada por la industria alimentaria nacional para desarrollar un nuevo producto que responda a las tendencias de alimentación saludable. También será una opción de producto alimenticio con alto valor agregado que responde al potencial para la producción de espirulina en Costa Rica como fuente alternativa de proteína.

Materiales y métodos

Localización

Las pruebas de prototipado y de análisis sensorial se realizaron en el Laboratorio de Análisis Sensorial de la Carrera de Ingeniería de Alimentos en la Sede de Guanacaste, Universidad de Costa Rica (UCR) durante febrero y noviembre del 2022. Las determinaciones de pH, densidad y ficocianina se realizaron en el Laboratorio de Química de Alimentos de la Carrera de Ingeniería de Alimentos entre julio y agosto del 2022. Las mediciones de grasa, humedad, cenizas, azúcares totales, fibra, sodio, hierro, calcio, vitamina C, polifenoles y carotenoides se analizaron en el Laboratorio de Química del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), en la Sede Rodrigo Facio, UCR, durante octubre 2022 y enero 2023.

Materiales

Se utilizó espirulina (*Arthrospira* sp.) en polvo de la marca *Sun is Shining*[®]. Se utilizaron jugos de piña (13,1 °Brix, pH 3,68), de maracuyá (14,3 °Brix, pH 2,90), de naranja (10,9 °Brix, pH 3,81) y el aceite esencial de naranja. Los vegetales apio, pepino, hierbabuena y jengibre se adquirieron frescos de un proveedor local. Los aditivos carboximetilcelulosa (CMC), ácido cítrico y ácido ascórbico utilizados fueron de grado alimentario. Se utilizó azúcar cruda no refinada.

Ingredientes seleccionados y procesamiento de la bebida

Los ingredientes fueron seleccionados mediante la elaboración de una matriz bibliográfica de productos similares en el mercado y un cuestionario realizado mediante el software de administración de encuestas formularios de Google (*Google Forms*, por su nombre en inglés) aplicado a 66 potenciales consumidores. En esta matriz se definieron los ingredientes por utilizar. De acuerdo con los resultados, se desarrolló una formulación base del prototipo de bebida verde compuesta por frutas, vegetales, endulzante y espirulina. El prototipo de bebida fue acidificado a un pH menor a 4,2. Los ingredientes y proporción utilizada en la bebida fueron agua (49,7 %), jugo de piña (17,6 %), jugo de naranja (10,0 %), jugo de maracuyá (5,7 %), azúcar cruda (5,0 %), pepino (3,6 %), jengibre (2,6 %), hierbabuena (2,0 %), espirulina (2,0 %), apio (1,4 %), ácido cítrico (0,2 %), carboximetilcelulosa (0,1 %), aceite esencial de naranja (0,1 %) y ácido ascórbico (0,03 %).

Para la preparación de las bebidas, se siguió el proceso detallado en la Figura 1. El tratamiento térmico realizado consistió en un calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 87 °C, temperatura a la cual se procedió

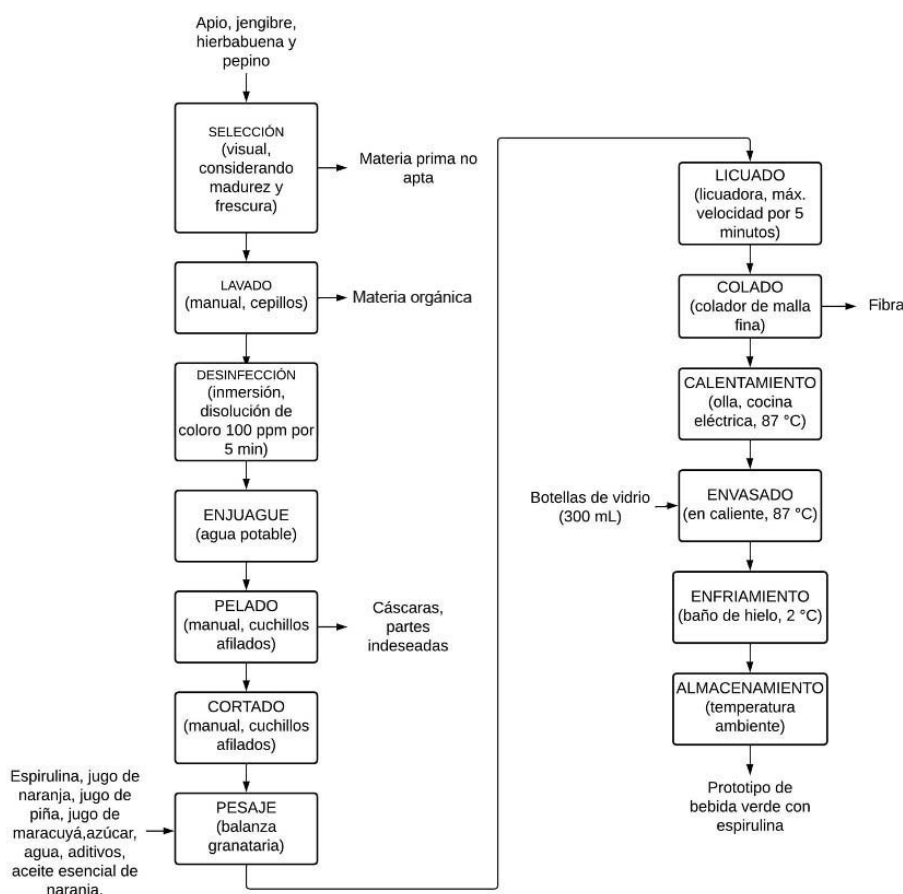


Figura 1. Diagrama de flujo de la elaboración de una bebida verde con el llenado en caliente como tratamiento térmico. Sede de Guanacaste, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

Figure 1. Flow chart of the preparation of a green beverage using hot filling as heat treatment. Guanacaste campus, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

a realizar un llenado en caliente en botellas de vidrio de 300 mL. Los envases se colocaron en posición invertida durante tres minutos para esterilizar la tapa del envase (Padilla-Zakour, 2009). Como cuidado adicional durante el proceso, la carboximetilcelulosa se dispersó en una parte del azúcar de la formulación previo a su incorporación. Las bebidas fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C.

Selección de rangos de ingredientes

Se prepararon doce prototipos de bebida a partir de la formulación base. Se varió la proporción de frutas/vegetales (5 niveles), azúcar (3 niveles) y espirulina (4 niveles) los niveles se muestran en el Cuadro 1. Los ingredientes evaluados (espirulina, azúcar y frutas/vegetales) fueron los que mostraron mayor efecto en las características sensoriales del producto. El ingrediente frutas/vegetales se elaboró con jugo de piña, jugo de naranja, apio, pepino, jengibre, jugo de maracuyá y hierbabuena, siempre en la misma proporción. El agua, estabilizante, antioxidante y regulador de la acidez mantuvieron fija su cantidad en todas las formulaciones.

Cuadro 1. Proporciones de espirulina, azúcar y frutas/vegetales de las formulaciones evaluadas en el panel sensorial tipo *bench testing*. Sede de Guanacaste, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

Table 1. Proportions of spirulina, sugar, and fruits/vegetables of the formulations evaluated in the *bench testing* type sensory panel. Guanacaste campus, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

Ingrediente	Proporción (%)
Espirulina	0, 2, 4, 5
Azúcar	5,0, 8,5, 10,0
Frutas/vegetales	38, 40, 43, 48, 50

Las 12 variaciones fueron evaluadas mediante una prueba sensorial tipo *bench testing*, el cual permitió definir las proporciones de límites máximos y mínimos de los factores en estudio. El *bench testing* se utilizó como metodología para evaluar muestras de prototipado de forma rápida. Esto con el objetivo de eliminar las muestras que serían rechazadas de manera unánime por los panelistas, según como establecen Linskens y Jackson (1988). Las cantidades máximas y mínimas de cada ingrediente que no fueron rechazadas por los panelistas se usaron como los máximos y mínimos de los factores en el diseño experimental.

Diseño experimental de mezclas y modelo matemático

Se utilizó un diseño experimental de mezclas del tipo llenado del espacio (*space filling design*) con espirulina, azúcar y frutas/vegetales como factores y agrado general como variable respuesta. El diseño se obtuvo mediante el programa estadístico JMP16. Los factores evaluados fueron restringidos a un rango con un límite mínimo y uno máximo, ya que no era factible su uso en el rango de 0 % a 100 %. Las once mezclas de la bebida utilizadas en el diseño experimental y las cinco formulaciones usadas para la verificación del modelo matemático se muestran en la Figura 2.

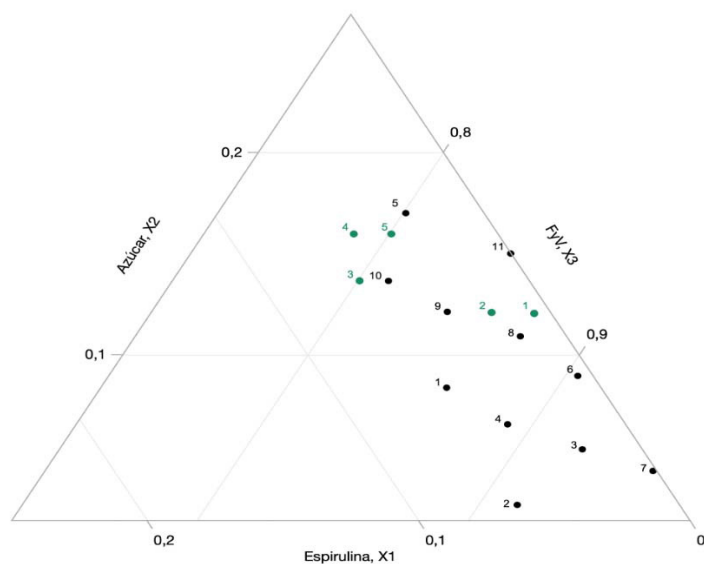


Figura 2. Diagrama ternario obtenido con el programa estadístico JMP16 que representa el plano geométrico de los once prototipos de bebida evaluados en el diseño experimental (puntos negros) y los cinco prototipos de bebida utilizados para la verificación del modelo (puntos verdes). Sede de Guanacaste, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

Figure 2. Ternary diagram obtained with the JMP16 statistical program that represents the geometric plane of the eleven drink prototypes evaluated in the experimental design (black dots) and the five drink prototypes used for model verification (green dots). Guanacaste campus, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

Evaluación sensorial

Las once formulaciones (Figura 2-puntos negros) se evaluaron en un panel sensorial de agrado con 95 consumidores ($n=95$) conformado por hombres y mujeres de edades entre los 18 y 65 años, residentes de Liberia, Guanacaste, consumidores de bebidas a base de frutas y vegetales, y que no presentaban alergias alimentarias. La evaluación sensorial se llevó a cabo por medio de una escala hedónica híbrida (Villanueva et al., 2005). Los promedios de agrado general obtenidos en la evaluación sensorial fueron analizados en el *software* estadístico JMP16.

Análisis estadístico

Los promedios de agrado general se ajustaron al modelo polinomial de *Scheffe* y el ajuste del modelo se evaluó por medio de los parámetros estadísticos coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de determinación ajustado ($R^2 - \text{adj}$) y la probabilidad del modelo (p). Se obtuvo el modelo matemático (ecuación de predicción) del diseño con el cual se logra predecir la variable respuesta de agrado sensorial. Para la construcción del modelo matemático se tomaron en cuenta los coeficientes que resultaron significativos ($p < 0,05$).

Zona óptima de agrado general y función de deseabilidad

La zona óptima fue identificada a partir de gráficos de contorno (Figura 3) obtenidos en el programa JMP16, en los cuales se visualiza el efecto de los factores espirulina, azúcar, frutas/vegetales, sobre la variable respuesta de agrado general. La función de deseabilidad se estimó con el programa estadístico JMP16, a partir de los valores de agrado general obtenidos para las once formulaciones del diseño experimental. El valor de deseabilidad se puede encontrar entre 0-1, donde una deseabilidad de 1 significa que el agrado alcanza el valor óptimo o ideal (Rudnykh & López-Ríos, 2018).

Verificación del modelo

Se realizó la verificación del modelo con cinco muestras experimentales y una muestra comercial marca *Nu*[®], mediante un panel de agrado general con 27 consumidores. Mediante el programa estadístico JMP16, se determinó el rango de agrado predicho por el modelo matemático. Para definir si el modelo es adecuado, el intervalo de confianza del valor predicho por el modelo debe traslaparse con el intervalo del valor experimental obtenido con un 95 % de confianza. Se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias por medio de la prueba Tukey con 95 % de confianza a las seis muestras, para determinar las diferencias significativas del agrado de la muestra comercial con las mezclas evaluadas.

Análisis fisicoquímicos de la bebida seleccionada

Se analizaron tres repeticiones del prototipo de bebida seleccionada (n=3). Todos los análisis fisicoquímicos se llevaron a cabo por triplicado. Se realizó un análisis proximal completo que incluye proteína (Association of Analytical Communities [AOAC], 2023a), grasa (AOAC, 2023b), azúcares (Quirós et al., 2019), humedad (AOAC, 2023c), cenizas (AOAC, 2023d), fibra (AOAC, 2023e) y vitamina C (Lykkesfeldt, 2000), así como sodio, hierro y calcio (AOAC, 2023f). Se analizaron compuestos bioactivos como polifenoles totales (Georgé et al., 2005), carotenoides (Hempel, 2013) y ficocianina (Abd El-Baky & El Baroty, 2012; Kissoudi et al., 2018; Lee et al., 2016; Patil et al., 2008). La ficocianina fue evaluada también para la espirulina en polvo utilizada como ingrediente.

En la caracterización de valores físicos se realizó el análisis de densidad y pH (AOAC, 2023g). Una vez obtenidos los resultados de composición química se calcularon los porcentajes del Valor de Referencia del Nutriente (VRN) para una porción de 300 mL, según lo establecido en el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.01.60:10 (Presidencia de la República et al., 2012) y por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) (Food and Drug Administration [FDA], 2023). Las declaraciones nutricionales se establecieron según el RTCA 67.01.60:10.

Resultados

Selección de rangos de ingredientes

Los rangos máximos y mínimos de los factores estudiados se presentan en el Cuadro 2 para la formulación de la mezcla y de la bebida. La formulación de la mezcla se compone de los ingredientes que fueron factores de estudio: espirulina, azúcar y frutas/vegetales, y la suma de estos corresponde siempre a 1,0. La formulación de la bebida corresponde a la totalidad de ingredientes, lo que incluyó aditivos y agua y se refiere al 100 % de los ingredientes en la formulación.

Cuadro 2. Límites máximos y mínimos de las variables independientes definidos en el panel sensorial tipo *bench testing* para obtener las formulaciones evaluadas en el panel sensorial con consumidores. Sede de Guanacaste, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

Table 2. Maximum and minimum limits of the independent variables defined in the bench testing sensory panel to obtain the formulations evaluated in the sensory panel with consumers. Guanacaste campus, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

Ingrediente	Formulación de la mezcla (rango 0-1) ¹		Formulación de la bebida (rango 0-100 %) ²	
	Límite mínimo	Límite máximo	Límite mínimo (%)	Límite máximo (%)
Espirulina (<i>Arthrospira</i> sp.)	0,000	0,060	0	3
Azúcar crudo	0,000	0,170	0	8,5
Frutas/vegetales	0,801	0,962	40	48

¹La formulación de la mezcla se refiere a la suma de los tres factores del diseño (espirulina, azúcar y fruta/vegetal). ²La formulación de la bebida se refiere al porcentaje de los factores en la bebida con todos sus ingredientes, donde 49,9 % representa a los ingredientes variables (ingredientes de la mezcla) y el restante 50,1 % de la formulación representa a los no variables (agua y aditivos). / ¹The formulation of the mix refers to the sum of the three factors in the design (spirulina, sugar and fruit/vegetable). ²The formulation of the beverage refers to the percentage of the factors in the drink with all its ingredients, where 49.9 % represents the variable ingredients (mixture ingredients) and the remaining 50.1 % of the formulation represents the non-variable ingredients (water and additives).

Los comentarios obtenidos por los participantes del *bench testing* indicaron que una bebida con un contenido de espirulina mayor al 3 % presenta un olor fuerte a pescado y una consistencia arenosa desagradable. La muestra con un contenido 0 % de espirulina resultó de sabor agradable y la bebida con un contenido de azúcar mayor al 8,5 % resultó muy dulce. La muestra con un contenido de frutas y vegetales mayor a 48 % se percibió como muy ácida, astringente y “pícosa”; la de contenido menor a 40 % resultó con una textura densa, pulposa y muy dulce.

Diseño experimental de mezclas y modelo matemático

Los resultados del panel sensorial de agrado con 95 consumidores para las once mezclas evaluadas se presentan en el Cuadro 3. El comportamiento obtenido en los resultados de grado general evidenció que los panelistas utilizaron de forma amplia la escala. Las calificaciones del agrado fueron desde 2,54 hasta 8,22, donde a mayor cantidad de espirulina, menor fue el agrado obtenido. Un contenido del 3 % de espirulina resultó con un promedio de agrado de 2,5; mientras que un 0 % se asoció a un promedio de agrado de 8,2.

Los parámetros de ajuste y bondad para la variable respuesta de agrado general, obtenidos como resultado de aplicar el diseño experimental de mezclas de llenado del espacio, fueron $p < 0,0001$, $R^2 = 0,97$ y $R^2\text{-adj.} = 0,96$. Estos resultados muestran un efecto de los factores sobre el agrado de las bebidas y que el modelo polinomial de *Scheffé* se ajusta a los datos experimentales. La ecuación matemática obtenida del modelo se muestra en la ecuación 1. Se evidenció que los tres factores (espirulina, azúcar y frutas/vegetales) comparten la significancia del efecto lineal y que el agrado general también resultó afectado por la interacción entre azúcar y frutas/vegetales.

$$\text{Agrado general} = -30,772 * X_1 - 87,713 * X_2 + 3,578 * X_3 + 146,953 * X_2 * X_3 \quad [1]$$

Donde X_1 es espirulina, X_2 es azúcar y X_3 son frutas/vegetales.

Cuadro 3. Promedio del agrado general obtenido para las once mezclas evaluadas en el panel sensorial con consumidores (n=95). Sede de Guanacaste, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

Table 3. Average of general liking values obtained for the eleven mixtures evaluated in the sensory panel with consumers (n=95). Guanacaste campus, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

Mezcla	Formulación de la mezcla (rango 0-1) ¹			Formulación de la bebida (rango 0-100 %) ²			Variable respuesta (agrado) ³
	Espirulina (<i>Arthrospira</i> sp.)	Azúcar	Frutas y vegetales	Espirulina	Azúcar	Frutas y vegetales	
1	0,06	0,08	0,86	2,84	4,18	42,91	4,27
2	0,06	0,03	0,92	2,98	1,28	45,65	2,54
3	0,02	0,05	0,93	1,10	2,66	46,17	4,87
4	0,04	0,07	0,89	2,17	3,27	44,48	4,88
5	0,03	0,17	0,80	1,44	8,48	40,01	7,05
6	0,01	0,09	0,92	0,28	4,47	45,18	7,44
7	0,00	0,04	0,96	0,07	2,12	47,73	5,76
8	0,02	0,11	0,87	0,85	5,44	43,63	7,26
9	0,04	0,12	0,84	1,89	6,05	41,99	6,09
10	0,05	0,14	0,81	2,59	6,81	40,52	6,00
11	0,00	0,15	0,85	0,00	7,48	42,43	8,22

¹La formulación de la mezcla representa la suma de los tres factores del diseño (espirulina, azúcar y fruta/vegetal). ²La formulación de la bebida se refiere al porcentaje en la totalidad de la formulación de la bebida con todos sus ingredientes. ³Resultados del agrado general con una escala hedónica híbrida de 0 a 10 puntos. / ¹The mix formulation represents the sum of the three design factors (spirulina, sugar, and fruit/vegetable). ²Beverage formulation refers to the percentage in the totality of the formulation with all its ingredients. ³Overall liking results with a hybrid hedonic scale from 0 to 10 points.

Zona óptima de agrado general

El efecto de la variable respuesta agrado general al variar los niveles de los factores y sus combinaciones se muestra en los diagramas de contorno de la Figura 3. Las proporciones e interacciones de las tres variables independientes estudiadas generaron efectos que se representan en la distribución y dirección de las líneas de colores. Cada línea corresponde a un valor de agrado específico.

Función de deseabilidad

La formulación óptima de la bebida, generada mediante la función de deseabilidad de JMP16, consistió en 0,0 % de espirulina, 9,5 % de azúcar y 40,4 % de F/V. Esta arrojó un valor de deseabilidad de 0,99, cercano al máximo posible en la escala de 0,0 a 1,0. Para esta formulación óptima, el agrado general predicho fue de 8,85, lo cual corresponde al valor máximo alcanzable según el modelo predictivo. No obstante, esta formulación óptima no se consideró para la etapa posterior de caracterización, ya que no contenía espirulina, y el objetivo del estudio fue proponer una formulación que incluyera este componente.

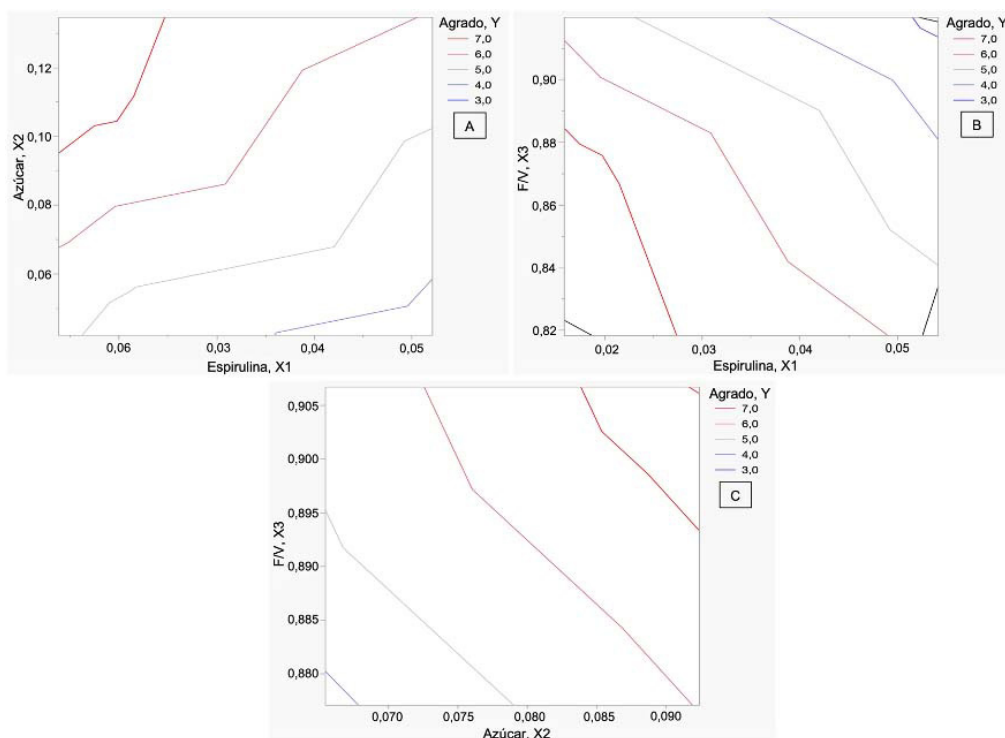


Figura 3. Diagramas de contorno del comportamiento entre azúcar y espirulina (*Arthrospira* sp.) (A), frutas y vegetales y espirulina (B) y frutas y vegetales y azúcar (C) obtenidos luego de la evaluación de once prototipos de bebida verde con espirulina en un panel sensorial con 95 consumidores. Sede de Guanacaste, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

Figure 3. Contour diagrams of the behavior between sugar and spirulina (*Arthrospira* sp.) (A), fruits and vegetables and spirulina (B) and fruits and vegetables and sugar (C) obtained after the evaluation of eleven prototypes of green drinks with spirulina in a sensory panel with 95 consumers. Guanacaste campus, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

Verificación del modelo

Se realizó con un panel de veintisiete personas, quienes evaluaron cinco mezclas distintas y una muestra comercial. Los valores experimentales obtenidos se solaparon con los predichos por el modelo matemático con un 95 % de confianza (Cuadro 4). Esto confirmó que el modelo fue capaz de predecir el agrado de manera precisa.

Según la comparación de medias se determinó que las mezclas con un agrado general que presentaron diferencias significativas de la muestra comercial (P6) fueron las P3 y P4, esto con un 95 % de confianza. Las mezclas P1, P2 y P5 resultaron con una diferencia no significativa en el agrado con respecto a la muestra comercial. Para efectos de la caracterización fisicoquímica, se seleccionó el prototipo 5 ya que se ajustaba mejor al objetivo de la investigación.

Análisis fisicoquímicos del prototipo seleccionado

La bebida seleccionada para esta etapa fue la P5 dado que contaba con el mayor contenido de espirulina y no presentaba diferencias significativas en el agrado con el producto comercial marca Nu® (P6) (Cuadro 4). A la formulación seleccionada se le realizó la caracterización nutricional y los resultados se reportan en el Cuadro 5.

Cuadro 4. Promedios predichos de la variable respuesta agrado según el modelo y obtenidos por experimentación en la verificación del modelo del diseño experimental (n=27 consumidores). Sede de Guanacaste, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

Table 4. Predicted averages of the response variable liking according to the model and obtained by experimentation for verification of the experimental design model (n=27 consumers). Guanacaste campus, Universidad de Costa Rica, Liberia, Costa Rica, 2022.

Mezcla/ Prototipo	Formulación de la mezcla (Rango 0-1)			Formulación de la bebida (Rango 0-100 %)			Variable respuesta agrado general		
	E	A	F/V	E	A	F/V	Agrado promedio*	Respuesta obtenida (±95 % de confianza)**	Respuesta predicha***
P1	0,01	0,12	0,87	0,32	6,19	43,40	7,10 ^{ab}	6,30-7,89 ⁺	7,45-8,32
P2	0,02	0,12	0,86	1,01	6,11	42,80	7,29 ^{ab}	6,73-7,85 ⁺	6,79-7,45
P3	0,06	0,14	0,80	3,00	6,94	39,99	6,37 ^b	5,63-7,11 ⁺	4,67-5,71
P4	0,05	0,16	0,79	2,50	7,99	39,44	5,95 ^b	5,05-6,86 ⁺	5,15-6,50
P5	0,04	0,16	0,80	2,00	7,90	40,03	6,70 ^{ab}	5,82-7,58 ⁺	5,85-6,95
P6	Bebida comercial (0,06 % extracto espirulina)						7,94 ^a	6,97-8,91	N.A.

*Rangos que presentan traslape entre el rango predicho por el modelo y el obtenido de forma experimental. *Letras diferentes representan promedios diferentes según la prueba Tukey. **Valores experimentales expresados como intervalo al 95 % de confianza. ***Intervalo calculado con los coeficientes brindados por el programa estadístico al -95 % y al 95 %. NA=No Aplica, corresponde a la formulación comercial. E: espirulina. A: azúcar, F/V: frutas y vegetales. / *Ranges showing overlap between the range predicted by the model and that obtained experimentally. *Different letters represent different averages according to the Tukey test. **Experimental values expressed as an interval at 95 % confidence. ***Interval calculated using the coefficients provided by the statistical program at -95 % and 95 %. NA= Not applicable, corresponds to the commercial formulation. E: Spirulina. A: Sugar, F/V: Fruits and vegetables.

Cuadro 5. Caracterización nutricional para una porción de 300 mL del prototipo seleccionado de bebida verde con 2,0 % de espirulina (n=3). Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 2022-2023.

Table 5. Nutritional characterization for a 300 mL portion of the selected prototype of green drink with 2.0 % spirulina (n=3). Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 2022-2023.

Nutriente	Cantidad	VRN (%)*
Grasa total	0,0 ± 0,0 g	0
Carbohidratos	40,7 ± 0,5 g	15
Azúcar total	38,7 ± 0,3 g	N.A.
Azúcar añadida	24,0 ± 0,0 g	48
Fibra dietética	2,0 ± 0,0 g	7
Proteína	5,0 ± 0,7 g	10
Sodio	62,5 ± 3,0 mg	3
Fósforo	93,1 ± 3,7 mg	8
Vitamina C	94,9 ± 23,5 mg	105
Calcio	66,3 ± 3,2 mg	8
Magnesio	39,6 ± 0,7 mg	13
Hierro	7,6 ± 0,3 mg	44
Zinc	1,1 ± 0,2 mg	8
Polifenoles totales**	139,5 ± 2,7 mg	N.A.
Carotenoides totales***	2,3 ± 0,2 mg	N.A.
Ficocianina	33,1 ± 0,3 mg	N.A.

*Porcentaje del valor de referencia del nutriente (VRN) recomendado por FDA y RTCA 67.01.60:10A, basado en una dieta de 8374 kJ (2000 kcal). **Equivalentes de ácido gálico. ***Equivalentes de beta-caroteno. N.A.= No aplica. / *Percentage of the reference value of the nutrient recommended by FDA and RTCA 67.01.60:10A, based on a diet of 8374 kJ (2000 kcal). **Equivalentents of gallic acid. ***Equivalentents of beta-carotene. N.A.= Not applicable.

Los datos se presentan para una porción de 300 mL de la bebida como una equivalencia en gramos y del %VRN (valor de referencia de nutrientes) de cada nutriente en el prototipo.

Se encontró que para la porción de 300 mL de bebida se pueden asignar las siguientes declaraciones nutricionales: bajo en sodio, fuente de proteína y magnesio. El producto desarrollado también es rico en hierro y vitamina C. Este último nutriente corresponde el 105 % de VRN para una persona consumidora de 2000 kcal diarias, según lo establecido por el FDA y el Reglamento Técnico Centroamericano (FDA, 2023; Presidencia de la República et al., 2012).

Con respecto a la ficocianina se evaluó el contenido en la espirulina en polvo marca *Sun is Shining*[®] utilizada en la formulación de la bebida. El contenido de ficocianina resultante fue de 2334 mg/100 g polvo. En los análisis físicos de la bebida se obtuvo un pH final de 3,93 y una densidad de 1,05 g/mL.

Discusión

En la selección de los rangos de los ingredientes de la mezcla (Cuadro 2), los consumidores rechazaron sabores poco o muy dulces, ácidos o desagradables. El sabor desagradable se asocia con la espirulina debido a que representa un reto en el desarrollo de productos por sus notas a olor de pescado. El rango de aceptación de la espirulina fue de 0 % a 3 %, y a partir de este porcentaje el producto fue rechazado. Este resultado es esperado por la poca tradición del consumo de algas en Costa Rica (Salas Murillo, 2020). Los resultados obtenidos de preferencia al contenido de azúcar alto resulta ser común debido a hábitos y costumbres culturales de los consumidores (Gutiérrez Vergary & Tello Echeverría, 2018).

El diseño experimental de mezclas del tipo “llenado del espacio” demostró que existe un efecto de los componentes de la mezcla (espirulina, azúcar y F/V) sobre el agrado ($p < 0,05$). Es decir, que al variar la proporción de los ingredientes, varía el agrado general obtenido por parte de los consumidores. Los coeficientes de determinación obtenidos, $R^2=0,97$ y $R^2\text{-adj}=0,96$, demuestran que el modelo se ajustó a los datos experimentales. Esto significa que el modelo polinomial de *Scheffe* fue adecuado para el modelado de los datos. Estos resultados permiten obtener una ecuación matemática que sí puede ser utilizada para predecir el valor de agrado general de la bebida al variar las cantidades de los ingredientes en estudio.

En los diagramas de contorno se evidenciaron las interacciones entre los ingredientes que generan un agrado determinado de la bebida (Figura 3). Se identificó que al aumentar el contenido de azúcar se puede aumentar el de espirulina. Al disminuir la cantidad de F/V, se debe disminuir la cantidad de espirulina. Esto indica que el azúcar tuvo un efecto amortiguador en el sabor de la espirulina, mientras que las F/V no. El resultado de la relación espirulina-azúcar, podría explicarse por la percepción positiva de los consumidores al sabor del azúcar, lo cual permite enmascarar sabores desagradables (Gutiérrez Vergary & Tello Echeverría, 2018). El ingrediente F/V aportó sabor ácido en la formulación, el cual resultó no ser compatible con el sabor de la espirulina.

La verificación del modelo matemático confirmó que el modelo obtenido en este estudio sí logra predecir el agrado general de forma correcta, dado que el rango de confianza obtenido de forma experimental se traslapa con el predicho con un 95 % de confianza (Cuadro 4). Este hallazgo permite extrapolar o predecir resultados de agrado general de la bebida al modificar los ingredientes en estudio. Esto permite contar con una herramienta útil para una futura optimización del prototipo (Salamanca Grosso et al., 2015).

La “formulación óptima” obtenida a través de la función de deseabilidad estimada por el modelo se asoció con un valor de agrado de 8,8 y contenido de 0,0 % de espirulina. La función de deseabilidad permitió identificar la combinación de los factores (espirulina, F/V, azúcar) con la cual se logra el valor óptimo de la variable respuesta de agrado general (Rudnykh & López, 2018). La formulación óptima no deberá ser seleccionada como la recomendada para el producto, ya que esta decisión debería tomar en cuenta otros aspectos importantes tales como el objetivo de

estudio, costos de producción, funcionalidad de los ingredientes y aceptación del mercado (Halagarda & Suwała, 2018; Ruiz-Capillas et al., 2021; Wichchukit & O'Mahony, 2015).

Si se seleccionara una formulación con base en la “formulación óptima” se podrían seleccionar la P1 o P2 (Cuadro 4). Estas mezclas obtuvieron una alta calificación de agrado, pero contienen muy poca espirulina. En este estudio la utilidad del modelo consistió en la identificación y selección de la formulación con la mayor cantidad de espirulina y al mismo tiempo niveles aceptables de agrado general, no diferenciables de la competencia, como la formulación P5 (Cuadro 4). Esto posiciona al diseño experimental de mezclas basado en el agrado sensorial como una herramienta práctica, fundamentada en evidencia científica y aplicable a la resolución de los retos de formulación en la industria de los alimentos (Salamanca Grosso et al., 2015; Wichchukit & O'Mahony, 2015).

La formulación seleccionada (P5) contiene una mayor cantidad de espirulina (2 %) que las bebidas comerciales y un agrado general comparable a la bebida marca *Nu*[®] (Cuadro 4). Las bebidas comerciales *Nu*[®] e *Innocent Drinks*[®] reportan un contenido de 0,06 % y 0,8 % de extracto de espirulina (Innocent Drinks, n.d.; Nu Smoothie, n.d.). Una de las posibles razones por las que las bebidas disponibles en el mercado contienen poca espirulina es por su sabor desagradable. Los resultados del presente estudio muestran que la combinación de ingredientes utilizados en la bebida como el azúcar y aromáticos como jengibre, hierba buena y aceite esencial de naranja, permitieron enmascarar el sabor poco agradable de la espirulina.

En la caracterización de la bebida (Cuadro 5) se encontró que según lo establecido por el FDA y el RTCA, a una porción de 300 mL se le pueden atribuir cinco declaraciones nutricionales (FDA, 2023; Presidencia de la República et al., 2012). Entre estas destaca que es fuente de proteína, la cual es aportada por la espirulina (Kumar et al, 2022). Este valor nutricional puede resultar llamativo para los consumidores puesto que no es común encontrar un alto contenido de proteína en bebidas comerciales a base de frutas y vegetales. Por ejemplo la bebida comercial *Nu*[®] tiene 2,1 g de proteína (Nu Smoothie, n.d.), mientras que el prototipo seleccionado contiene 5,0 g, ambas por cada porción de 300 mL.

La inclusión de espirulina en la formulación de la bebida verde permitió elevar significativamente el contenido proteico, esto al superar el 10% del VRN y con una proteína de buena calidad. La espirulina es rica en vitaminas del complejo B, vitamina E, y minerales (Gutiérrez-Salmeán et al., 2015; Malpartida et al., 2022), lo que incrementa los porcentajes de VRN de estos nutrientes, y mejora el valor nutricional de la bebida. Una desventaja nutricional del prototipo desarrollado es el contenido de azúcar, el cual es de 48 % del VRN para la porción de 300 mL. Esto confirma el hallazgo en cuanto al efecto enmascarador del azúcar sobre la espirulina, dado que se agregó una alta cantidad de azúcar para lograr una bebida verde de sabor aceptable por los consumidores.

Destaca el valor nutricional obtenido en la bebida para vitamina C y hierro, ya que la porción aporta el 105 % y 44 % del VRN, para estos dos micronutrientes esenciales. El contenido de vitamina C mejora el sistema inmunológico y está asociado con las frutas y vegetales utilizados en la formulación (Martí et al., 2009). El contenido de hierro obtenido es aportado a la bebida por la espirulina. La espirulina se destaca como un ingrediente rico en hierro, con una concentración de 28,5 mg de hierro en 100 gramos de espirulina (Marlina & Nurhayati, 2020).

Las frutas, vegetales y espirulina aportaron a la bebida potentes antioxidantes como carotenoides y polifenoles que combaten el estrés oxidativo (Navarro González et al., 2017). Se ha reportado que un consumo por encima de 600 mg de polifenoles al día resulta en un efecto protector ante enfermedades crónicas (Mohammed et al., 2023; Navarro González et al., 2017). Basado en ese criterio, un contenido de 139,5 mg de polifenoles por 300 mL de bebida aporta cerca del 23 % de la cantidad de polifenoles recomendada por estos autores. En cuanto a la cantidad de carotenoides, se obtuvieron 2,3 mg en 300 mL de la bebida. Se ha reportado que la espirulina produce carotenoides como beta-caroteno, zeaxantina y beta-criptoxantina (Mohammed et al., 2023).

El contenido final de ficocianina en la bebida resultó más bajo de lo esperado. Esto, si se parte del contenido analizado en la espirulina en polvo, que fue de 2334 mg/100 g. Se estimaría que la espirulina utilizada aporta 140 mg de ficocianina correspondientes a 6 g de la espirulina en polvo, que a su vez, es la cantidad de espirulina contenida en 300 g del prototipo seleccionado (P5, 2 % espirulina). Sin embargo, la concentración de ficocianina analizada en la bebida fue de 33,1 mg en 300 mL de bebida (o 31,5 mg/300 g bebida).

La pérdida del contenido de ficocianina en la bebida final se puede explicar por la temperatura del tratamiento térmico y otros factores como el pH, la luz y la presencia de oxígeno (Moreno García, 2016). La ficocianina es inestable a una temperatura superior a los 50 °C y fuera del rango de pH de 5 a 8, condiciones en las cuales se produce la desnaturalización de su estructura proteica (Pez Jaeshke et al., 2021). Esto plantea el reto a futuro de proponer un proceso mediante el cual se apliquen estrategias para la conservación de este importante pigmento.

El pH obtenido en la bebida seleccionada fue 3,93, correspondiente a una bebida acidificada, lo cual explicaría, en parte, la degradación de la ficocianina. Este pH presenta una ventaja a nivel de proceso ya que se puede obtener una bebida estable a temperatura ambiente al someterse a un tratamiento térmico con llenado en caliente (Padilla-Zakour, 2009). Sin embargo, se recomienda que la comercialización de la bebida sea en refrigeración y en un empaque opaco para conservar compuestos bioactivos sensibles a la temperatura y a la luz, tales como la vitamina C, polifenoles, carotenoides y la ficocianina (Gutiérrez Valencia et al., 2016; Mathias Rettig, 2014; Moreno García, 2016).

Conclusiones

Se desarrolló un prototipo de bebida verde con un alto valor nutricional y que utiliza la espirulina como fuente de proteína sostenible. La bebida resultó con un contenido de 2 % de espirulina, el cual es mayor al de las bebidas similares disponibles en el mercado y aporta 5 g de proteína en una porción de 300 mL. La bebida resultó baja en sodio (3 % VRN), fuente de proteína (10 % VRN) y magnesio (13% VRN) y rica en hierro (44 % VRN) y vitamina C (105 % VRN).

El diseño experimental de mezclas basado en la evaluación de agrado sensorial permitió identificar esa formulación con alto contenido de espirulina y un agrado sensorial no diferenciable a una bebida comercial. Este diseño constituye una herramienta valiosa para el desarrollo de productos en la industria alimentaria. El presente trabajo muestra una opción de procesamiento viable para empresas de cualquier tamaño interesadas en comercializar en el mercado costarricense una bebida verde con espirulina. Este desarrollo sería una opción de producto para consumidores que buscan una alimentación saludable.

Agradecimientos

Las autoras agradecen a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento del proyecto dentro del cual se desarrolló este trabajo, proyecto 735-C0-455 “Desarrollo de alimentos enriquecidos con biomasa de la cianobacteria *Arthrospira* sp. (espirulina) que contengan compuestos bioactivos con beneficios potenciales para la salud humana”. Se agradece a la Sede de Guanacaste y el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos por el apoyo en el uso de los laboratorios e instalaciones para realizar esta investigación.

Conflicto de intereses

Las autoras declaran que no existe ningún conflicto de interés en esta investigación.

Referencias

Abd El-Baky, H. H., & El Baroty, G. S. (2012). Characterization and bioactivity of phycocyanin isolated from *Spirulina maxima* grown under salt stress. *Food & Function*, 3, 381–388. <https://doi.org/10.1039/c2fo10194g>

- Alfaro-Alfaro, A. E., Alpízar-Cambronero, V., Duarte-Rodríguez, A. I., Feng-Feng, J., Rosales-Leiva, C., & Mora-Román, J. J. (2020). C-ficocianinas: modulación del sistema inmune y su posible aplicación como terapia contra el cáncer. *Tecnología en Marcha*, 33(4), 125–139. <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4653>
- Association of Analytical Communities. (2023a). Official method 920.152. Protein in fruit products: Kjeldahl method. In G. W. Latimer, Jr. (Ed.), *Official methods of analysis of AOAC International* (Chapter 37.1.35, 22nd ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.3388>
- Association of Analytical Communities. (2023b). Official Method 922.06. Fat in flour: Acid hydrolysis method. In G. W. Latimer, Jr. (Ed.), *Official methods of analysis of AOAC International* (Chapter 32.1.14, 22nd ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.2938>
- Association of Analytical Communities. (2023c). Official method 920.151. Solids (Total) in fruits and fruit products. In G. W. Latimer, Jr. (Ed.), *Official methods of analysis of AOAC International* (Chapter 37.1.12, 22nd ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.3365>
- Association of Analytical Communities. (2023d). Official method 940.26. Ash of fruits and fruit products. In G. W. Latimer, Jr. (Ed.), *Official methods of analysis of AOAC International* (Chapter 37.1.18, 22nd ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.3371>
- Association of Analytical Communities. (2023e). Official method 985.29. Total dietary fiber in foods: Enzymatic–gravimetric method. In G. W. Latimer, Jr. (Ed.), *Official methods of analysis of AOAC International* (Chapter 45.4.07, 22nd ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.3808>
- Association of Analytical Communities. (2023f). Official method 985.35. Minerals in infant formula, enteral products, and pet foods: Atomic absorption spectrophotometric method. In G. W. Latimer, Jr. (Ed.), *Official methods of analysis of AOAC International* (Chapter 50.1.14, 22nd ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.4040>
- Association of Analytical Communities. (2023g). Official method 981.12. pH of acidified foods (2023). In G. W. Latimer, Jr. (Ed.), *Official methods of analysis of AOAC International* (Chapter 42.1.04, 22nd ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.3563>
- Blanco, P. (2011, enero 19). Estudian potencial de explotación de microalgas nativas. *Seminario Universidad*. <https://historico.semanariouniversidad.com/suplementos/crisol/estudian-potencial-de-explotacin-de-microalgas-nativas/>
- Böcker, L., Ortman, S., Surber, J., Leeb, E., Reineke, K., & Mathys, A. (2019). Biphasic short time heat degradation of the blue microalgae protein phycocyanin from *Arthrospira platensis*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 52, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.11.007>
- Buruk Sahin, Y., Aktar Demirtas, E., & Burnak, N. (2016). Mixture design: a review of recent applications in the food industry. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 22(4), 297–304. <https://doi.org/10.5505/pajes.2015.98598>
- Cabrera Castro, J. de J. (2014). *Optimización de variables de proceso para la reducción del tiempo de reproceso en el reactor tipo Batch, en la manufactura de adhesivos PU por medio de diseño experimental MSR* [Tesis de Maestría, Centro de Innovación Aplicada a Tecnologías Competitivas]. Repositorio CIATEC. <https://ciatec.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1019/111>
- Di Giorgio, G., & Pérez, S. (2023). Aplicación del diseño de mezclas y metodologías sensoriales rápidas para la formulación de una galleta salada a base de harina de garbanzos. *Tekhné*, 26(3), 1–27. <https://doi.org/10.62876/tekhn.v26i3.6306>

- Food and Drug Administration. (2023). *Valor diario y porcentaje de valor diario en las etiquetas de información nutricional y complementaria*. <https://www.fda.gov/media/137914/download>
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1370–1373. <https://doi.org/10.1021/jf048396b>
- Gómez Payán, M. J., Romero López, R., Molina Arredondo, R. D., Terrazas Porras, S. M., & Núñez Ortega, O. (2015). Uso de la metodología del diseño por mezclas en el sector agrícola. *Culcyt*, 55(1), 201–211. <https://revistas.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/view/761/728>
- Gutiérrez-Salmeán, G., Fabila-Castillo, L., & Chamarro-Cervillos, G. (2015). Aspectos nutricionales y toxicológicos de Spirulina (*Arthrospira*). *Nutrición Hospitalaria*, 32(1), 34–40. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.9001>
- Gutiérrez Valencia, T. M., Hoyos Saavedra, O. L., & Cuervo Ochoa, G. (2016). Estudio cinético de la degradación térmica de trans- β - caroteno en uchuva. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(1), 126–134. <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/bioteologia/article/view/467>
- Gutiérrez Vergary, K. A., & Tello Echeverría, L. A. (2018). *Evaluación de la incorporación de espirulina sobre propiedades nutricionales y sensoriales de una galleta a base de harina de trigo y kiwicha* [Tesis de licenciatura, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas]. Repositorio Académico UPC. https://repositorioacademico.upc.edu.pe/bitstream/handle/10757/624916/Guti%c3%a9rrez_VK.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Halagarda, M., & Suwała, G. (2018). Sensory optimization in new food product development: a case study of polish apple juice. *Italian Journal of Food Science*, 30(2), 317–335. <https://doi.org/10.14674/IJFS-960>
- Hempel, J. (2013). *Characterization of morphological and chemical traits of *Bactris gasipaes* fruits with special reference to their carotenoid composition* [Master thesis, University of Hohenheim]. University of Hohenheim Repository. <https://www.stiftung-fiat-panis.de/images/DF/DF538.pdf>
- Hernández-Lepe, M. A., Wall-Medrano, A., Juárez-Oropeza, M. A., Ramos-Jiménez, A., & Hernández-Torres, R. P. (2015). Spirulina y su efecto hipolipemiente y antioxidante en humanos: una revisión sistemática. *Nutrición Hospitalaria*, 32(2), 494–500. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.32.2.9100>
- Innocent Drinks. (n.d.). *Innocent Plus*. Retrieved March 20, 2024, from <https://www.innocentdrinks.co.uk/things-we-make/innocent-plus>
- Kissoudi, M., Sarakatsianos, I., & Samanidou, V. (2018). Isolation and purification of food grade C-phycoyanin from *Arthrospira platensis* and its determination in confectionery by HPLC with diode array detection. *Journal of Separation Science*, 41(4), 975–981. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701151>
- Kumar, R., Hegde, A. S., Sharma, K., Parmar, P., & Srivatsan, V. (2022). Microalgae as a sustainable source of edible proteins and bioactive peptides – Current trends and future prospects. *Food Research International*, 157, Article 111338. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111338>
- Lee, S. -H., Lee, J. E., Kim, Y., & Lee, S. -Y. (2016). The production of high purity phycocyanin by *Spirulina platensis* using light-emitting diodes based two-stage cultivation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178, 382–395. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1879-5>
- Lietzow, J., Sashse, B., & Schäfer, B. (2022). Drinking your greens: green smoothies from a nutritional and toxicological point of view. *Ernährungs Umschau*, 69(8), 126–135. <https://doi.org/10.4455/eu.2022.024>

- Linskens, H. F., & Jackson, J. F. (1988). Wine analysis. In H. F. Linskens, & J. F. Jackson. (Eds.), *Wine analysis. modern methods of plant analysis* (Vol. 6, pp. 1–8). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-83340-3>
- Lykkesfeldt, J. (2000). Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography using subtraction methods: reliable reduction with tris [2-carboxyethyl] phosphine hydrochloride. *Analytical Biochemistry*, 282(1), 89–93. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4592>
- Malpartida, Y. R., Aldana, F. L., Sánchez, S. K., Gómez, H. L., & Lobo, P. J. (2022). Valor nutricional y compuestos químicos bioactivos de la espirulina: potencial suplemento alimenticio. *Ecuadorian Science Journal*, 6(1), 42–51. <https://doi.org/10.46480/esj.6.1.133>
- Marín-Prida, J., Llópiz-Arzuaga, A., Pavón, N., Pentón-Rol, G., & Pardo-Andreu, G. L. (2015). Aplicaciones de la CFicocianina: Métodos de obtención y propiedades farmacológicas. *Revista de ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 1(1), 29–43. <https://revistas.uh.cu/rcfa/article/view/5185/4372>
- Marlina, D., & Nurhayati, F. (2020). The effectiveness of spirulina compared with iron supplement on anemia among pregnant women in Indonesia. *International Journal of Caring*, 13(3), 1783–1787. https://www.internationaljournalofcaringsciences.org/docs/28_nurhayati_original_13_3.pdf
- Martí, N., Mena, P., Cánovas, J. A., Micol, V., & Saura, D. (2009). Vitamin C and the role of citrus juices as functional food. *Natural Product Communications*, 4(5), 677–700. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900040050>
- Mathias Rettig, K. A. (2014). *Estabilidad de pigmentos naturales, polifenoles y capacidad antioxidante de jugo de Murta (Ugni molinae Turcz.)* [Tesis de Magíster, Universidad Austral de Chile]. Repositorio de la Universidad Austral de Chile. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2014/egm444e/doc/egm444e.pdf>
- Mohammed, I. A., Ruengjitchatchawalya, M., & Paithoonrangsarid, K. (2023). Cultivation manipulating zeaxanthin-carotenoid production in *Arthrospira* (Spirulina) platensis under light and temperature stress. *Algal Research*, 76, Artículo 103315. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103315>
- Moreno García, L. C. (2016). *Estudio de la estabilidad de la C-Ficocianina* [Trabajo de grado, Universidad de Almería]. Repositorio de la Universidad de Almería. <https://repositorio.ual.es/handle/10835/4666>
- Navarro González, I., Periago, M. J., & García Alonso, J. F. (2017). Estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos en la población española. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 21(4), 320–326. <https://doi.org/10.14306/renhyd.21.4.357>
- Nu Smoothie (n.d.). *Green smoothie*. Retrieved March 20, 2024, from <https://nusmoothies.com/nos-jus/3>
- Ochoa Galarza, K., & Moyano Calero, W. (2022). Aplicaciones de la espirulina - planta marina: revisión panorámica. *Salud, Ciencia y Tecnología*, 2, Artículo 174. <https://doi.org/10.56294/saludcyt2022174>
- Padilla-Zakour, O. (2009). Good manufacturing practices. In N. Heredia, I. Wesley, & S. García (Eds.), *Microbiologically safe foods* (pp. 395–414). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470439074.ch20>
- Patil, G., Chethana, S., Madhusudhan, M. C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2008). Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 99(15), 7393–7396. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.028>
- Pez Jaeshke, D., Rocha Teixeira, I., Ferreira Marczak, L. D., & Domeneghini Mercali, D. (2021). Phycocyanin from Spirulina: A review of extraction methods and stability. *Food Research International*, 143, Article 110314. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110314>

- Presidencia de la República, Ministerio de Comercio Exterior, Economía Industria y Comercio, & Ministerio de Salud. (2012, 02 de julio). *Decreto ejecutivo N° 37295-COMEX-MEIC-S. Resolución N° 281-2012 (COMIECO-LXII) de 14 de mayo del 2012, modificaciones al Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.60:10 "Etiquetado Nutricional de Productos Alimenticios Preenvasados para Consumo Humano para población a partir de 3 años*. Sistema Costarricense de Información Jurídica. https://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=73307&nValor3=89923&strTipM=TC
- Quirós, A. M., Acosta, O. G., Thompson, E., & Soto, M. (2019). Effect of ethanolic extraction, thermal vacuum concentration, ultrafiltration, and spray drying on polyphenolic compounds of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) by-product. *Journal of Food Process Engineering*, 42(4), Article e13051. <https://doi.org/10.1111/JFPE.13051>
- Rudnykh, S. I., & López-Ríos, V. I. (2018). Elección de la función de deseabilidad para diseños óptimos bajo restricciones. *Revista EIA*, 15(30), 13–24. <https://doi.org/10.24050/reia.v15i30.903>
- Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Pintado, T., & Delgado-Pando, G. (2021). Sensory analysis and consumer research in new meat products development. *Foods*, 10(2), Artículo 429. <https://doi.org/10.3390/foods10020429>
- Salamanca Grosso, G., Reyes Méndez, L. M., Osorio Tangarife, M. P., & Rodríguez Arias, N. (2015). Diseño experimental de mezclas como herramienta para la optimización de cremolácteos de mango. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 2(1), 16–24. <https://doi.org/10.23850/24220582.166>
- Salas Murillo, O. (2020, febrero 11). *El cultivo de algas marinas revolucionaría la acuicultura nacional: un proyecto de ingeniería de biosistemas promueve el desarrollo de una industria de producción en Costa Rica*. Universidad de Costa Rica. <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2020/2/11/el-cultivo-de-algas-marinas-revolucionaria-la-acuicultura-nacional.html>
- Umaña Venegas, J. (2019, septiembre 11). Es factible producir microalgas para alimento animal y a la vez ayudar al ambiente. *Hoy en el TEC*. <https://www.tec.ac.cr/hoyeneltec/2019/09/11/factible-producir-microalgas-alimento-animal-vez-ayudar-ambiente>
- Vázquez Pérez, R. N., Hernández Uribe, F., Villegas Aguilera, M. M., Martínez Murillo, R., López García, K. E., Pérez Barragán, C. E., & Arredondo Vega, B. O. (2016). Evaluación del contenido de proteínas de la biomasa de Spirulina (*Arthrospira*) Maxima cultivada en condiciones ambientales en bioreactores. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 333–337. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/2/56.pdf>
- Villalta-Romero, F., Murillo-Vega, F., Martínez-Gutiérrez, B., Valverde-Cerdas, J., Sánchez-Kopper, A., & Guerrero-Barrantes, M. (2019). Biotecnología microalgal en Costa Rica: Oportunidades de negocio para el sector productivo nacional. *Tecnología En Marcha*, 32(9), 85–93. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4634>
- Villanueva, N. D. M., Petenate, A. J., & Da Silva, M. A. P. (2005). Performance of the hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. *Food Quality and Preference*, 16(8), 691–703. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2005.03.013>
- Wichchukit, S., & O'Mahony, M. (2015). The 9-point hedonic scale and hedonic ranking in food science: some reappraisals and alternatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(11), 2167–2178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6993>