



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

**“OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO PARA LA PURIFICACIÓN
DE C-FICOCIANINA A PARTIR DE LA *Spirulina maxima*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN QUÍMICA INDUSTRIAL

P R E S E N T A:

CRUZ DE JESÚS VERONICA

ASESORES:

DR. GABRIEL ARTURO ARROYO RAZO

DR. GERMÁN ALBERTO CHAMORRO CEVALLOS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Optimización de un proceso para la purificación de C-ficocianina a partir de la Spirulina
maxima

Que presenta la pasante: Veronica Cruz de Jesús

Con número de cuenta: 406083397 para obtener el Título de: Licenciada en Química Industrial

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 29 de septiembre de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo	
VOCAL	Q.F.B. Dalia Bonilla Martínez	
SECRETARIO	Dra. Raquel Gómez Pliego	
1er SUPLENTE	Dr. Hulme Ríos Guerra	
2do SUPLENTE	M. en C. Oscar Zúñiga Lemus	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

DEDICATORIAS

Este presente trabajo es dedicado a mi familia, en especial a mis padres y hermanos que los quiero con todo mi corazón.

A mis padres, a mi mamá **Yolanda**, gracias por enseñar a luchar a vivir desde el primer día que nací, por darme los principios universales de la vida, por tu enseñanza, dedicación y el apoyo en cada uno de mis sueños y decisiones.

A mi papá **Ángel**, por todo lo que me has brindado en este tiempo, gracias por confiar en mí, por darme la oportunidad de emprender este sueño.

A mis hermanos, **Cesar y Carlos**, a cada uno de ustedes por sus consejos que me dieron, por los momentos difíciles y de felicidad que hemos vivido en esta aventura universitaria y a ti Cesar por enseñarnos el camino de lo intelectual.

A **Manuel** y a **Diana**, por darme el regalo de ser tía en este año, por su hermoso hijo Jahzeel. Y sobre todo por sus consejos.

A **Lucia**, a ti por todos los momentos que has estado a mi lado cuando te he necesitado gracias hermana y por compartir los momentos de ser universitarias.

A mi tía **Isabel**, por darme el ejemplo de que no hay imposible para hacer lo que uno se propone.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores:

Deseo expresar en primer lugar mi más sincero agradecimiento a los Doctores. **Gabriel Arroyo** y **Germán Chamorro** por su constante apoyo y orientaciones durante el desarrollo del trabajo y por darme la oportunidad de ampliar mi formación como profesional.

A la Dra. **Roxana Olvera** del Departamento de Fisiología Vegetal de la ENCB del IPN, por el apoyo en el conocimiento del cultivo de la *Spirulina maxina* y al mismo tiempo por la donación del inóculo.

A la Dra. **Cañizares** y a la M. en C. **Dulce Hernández** del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, por brindarme el tiempo, la dedicación y por haberme permitido trabajar en sus instalaciones.

A la Dra. **Jaramillo** y a su grupo de alumnos en especial a **Pablo** y **Abril**, del laboratorio de Enzimología del Departamento de de Biotecnología del IPN, por el apoyo en el conocimiento de la técnica de ultrafiltración y por haberme permitido trabajar en sus instalaciones.

Al Dr. **Francisco** y a su esposa a la **Dra. Selene**, por el apoyo en la técnica de electroforesis.

A **Elena** y **Angélica** por ser mis compañeras de laboratorio, por la ayuda en algunas técnicas, y por haberme brindado su amistad durante este tiempo.

A todos los Doctores, maestros y compañeros del Departamento de Toxicología de la ENCB Unidad Zacatenco del IPN, haberme creado un clima favorable para hacer de mi trabajo y mi estancia en el laboratorio una experiencia muy positiva.

A mis sinodales a la Dra. **Raquel Gómez**, Dr. **Hulme Ríos**, Q.F.B. **Dalia Bonilla** y al M. en C. **Oscar Zúñiga**, por el tiempo y dedicación en la revisión de mi tesis.

A **Roxana** por la amistad que tenemos desde hace tiempo, por los consejos y por los momentos que hemos compartido gracias amiga eres una gran persona.

A **Miriaam, Jaime, Eli Cruz, Basset, Karen, Olivia, Julieta, Vero, Imelda, Cristian, Jorge, y Oscar**, gracias por su amistad y por todas las aventuras que hemos pasado durante este tiempo.

A mis compañeros de la generación 11 de Q.I.

A mi alma mater a la Universidad Nacional Autónoma de México sobre todo a la FESC Campo 1, por abrirme las puertas en mi formación profesional.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CIANOBACTERIA	3
2.1.2. Parámetros fisicoquímicos de crecimiento de cianobacteria	4
2.1.3. Importancia de las cianobacterias en el ambiente	6
2.2. <i>Spirulina maxima</i> (<i>Arthrospira</i>)	7
2.2.1. Antecedentes históricos de la <i>Spirulina maxima</i>	11
2.2.2. Importancia y aplicación actual de la <i>Spirulina maxima</i>	13
2.2.3. Compañías productoras	15
2.2.4. Moléculas de alto valor agregado	17
2.2.5. Ficobiliproteínas	17
2.2.6. Estructura y organización de las ficobiliproteínas	18
2.2.7. Importancia biotecnológica de la ficobiliproteínas	20
2.2.7.1. Como colorante	20
2.2.7.2. Como agente fluorescente	21
2.2.7.3. Como agente farmacéutico	22
2.2.8. Producción de ficobiliproteínas	23
2.3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS FICOBILIPROTEÍNAS	24
2.4. SISTEMA DE DOS FASES ACUOSOS DE PARTICIÓN	25
2.4.1. Introducción	25
2.4.2. Formación de dos fases	26
2.4.3. Material y equipo ATPS	30
2.4.4. Ventajas de ATPS	31
2.4.5. Aplicación del ATPS	31
2.5 ANTIOXIDANTE	32
3. HIPÓTESIS	33
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo general	33
4.2. Objetivos particulares	33

5. PARTE EXPERIMENTAL	34
5.1. Materiales y reactivo	34
5.2. METODOLOGÍA	36
5.2.1 Microorganismo y condiciones de cultivo	36
5.2.2. Determinación de la densidad celular	37
5.3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FICOBILIPROTEÍNAS	37
5.3.1. Rupturas celulares	38
5.3.2. Soluciones de extracción	39
5.4. PURIFICACIÓN DE LA C-FICOCIANINA	39
5.4.1. Sistema de dos fases acuosas de partición	40
5.4.2. Diafiltración más Cromatografía de intercambio iónico	41
5.4.3. Diafiltración más cromatografía de gel de filtración	41
5.4.4. Ultrafiltración	41
5.5. CARACTERIZACIÓN DE C-FICOCIANINA	42
5.5.1. Identificación de C-ficocianina por electroforesis en gel de poliacrilamida	42
5.5.2. Actividad de antioxidante en muestras de C-ficocianina por el método ABTS	43
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	45
6.1. Cultivo de <i>Spirulina maxima</i>	45
6.2. Estudio de ruptura celular	45
6.3. Purificación de C-ficocianina	47
6.4. Caracterización de C-ficocianina	53
6.4.1. Espectrofotometría UV/Vis	53
6.4.2. Identificación de C-ficocianina por electroforesis en gel de poliacrilamida	54
6.4.3. Actividad de antioxidante en muestras de C-ficocianina por el método ABTS	56
7. CONCLUSIÓN	58
8. BIBLIOGRAFÍA	59
9. APÉNDICE	63

GLOSARIO

ABTS	Ácido 2,2'-azino <i>bis</i> 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
AFA	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>
APC	Aloficocianina
ATPS	Sistema de dos fases acuosas
CINVESTAV	Centro de investigación de estudios avanzados
C-PC	C-ficocianina
DEAE-Celulosa	Dietilaminoetil-celulosa
ERO	Especies reactivas del oxígeno
IFP	Instituto Francés del Petróleo
KDa	Kilodalton
ORSTOM	Oficina de Investigación Científica y Tecnológica Ultramarina de París
PAGE	gel de poliacrilamida
PBPS	Ficobiliproteínas
PE	Ficoeritrina
PEG	Polietilenoglicol
SDS	Dodecilsulfato de sodio
R-SH	Grupo sulfuro o sulfidrilo
TRIS-HCl	Tris (Hidroximetil aminometano Clorhidrato)
UFC	Ultrafiltración

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Micrografía electrónica de la <i>Spirulina maxima</i> 9
Figura 2	A).- Cosechaban de la <i>Spirulina</i> por los aztecas (mexicas). B).- Mostrado en el códice de Florentino 11
Figura 3	Planta de producción de <i>Spirulina maxima</i> en la laguna Texcoco, México 13
Figura 4	Productos comerciales de la <i>Spirulina</i> en diferentes presentaciones 14
Figura 5	Cultivo de <i>Spirulina</i> . A).- Cultivo en sistemas abiertos; B).- Fotoreactor 15
Figura 6	Estructura de la C-ficocianina. A).- Estructura tridimensional de la C-ficocianina. B).- Estructura química de los tetrapirroles de cadena abierta de C-ficocianina 19
Figura 7	Modelo del ficobilisoma con el ordenamiento fundamental de las ficobiliproteínas 20
Figura 8	Diagrama de fases para un sistema de dos fases acuosas 27
Figura 9	A).- Cultivo de <i>Spirulina maxima</i> en un Fotoreactor plano con flujo de aire continuo e iluminación con luz blanca B).- Curva de crecimiento durante 14 días 45
Figura 10	A) <i>Spirulina maxima</i> aislada, vista al microscopio antes de la ruptura celular. B) después de la ruptura celular por el método congelación/descongelación mas agitación 47
Figura 11	A) .- Fase superior. B).- la interfase. C).- Fase inferior 48
Figura 12	Diagrama de flujo de los diferentes procesos de purificación de C-ficocianina 48
Figura 13	C-ficocianina liofilizada 50
Figura 14	Espectros de UV-Vis de C-ficocianina de <i>Spirulina maxima</i> . A).- muestra de C-CP comercial sigma. B).- Extracto de C-PC. C).- después de la ultrafiltración 54
Figura 15	Gráfica de calibración de estándares de pesos moleculares, para la determinación del peso molecular de C-ficocianina de <i>Spirulina maxima</i> mediante en gel de SDS-PAGE 55
Figura 16	Gel de poliacrilamida obtenido por electroforesis del proceso 3, extracción y recuperación de C-PC 55
Figura 17	Gel de poliacrilamida obtenido por electroforesis de las diferentes muestras de <i>Spirulina</i> 55
Figura 18	Curva patrón usando como antioxidante en µg de Trolox 57

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Clasificación científica de la <i>Spirulina maxima</i>	8
Tabla 2	Composición Bioquímica de <i>Arthrospira</i>	10
Tabla 3	Algunos productores comerciales de <i>Spirulina</i>	16
Tabla 4	Polímeros que se usan en el sistema de dos fases acuosas	30
Tabla 5	Característica de los reactivos usados	35
Tabla 6	Composición del medio de cultivo Zarrouk	37
Tabla 7	Comparación de diferentes técnicas de ruptura celular de la pureza y concentración de PBP en la cianobacteria de <i>Spirulina maxima</i> , utilizando agua destilada	46
Tabla 8	Concentración y purificación extraídas de las células de <i>Spirulina maxima</i> por el método de congelación/descongelación mas agitación a 20 °C con diferentes soluciones de extracción	47
Tabla 9	Evaluación de purificación y recuperación en porcentaje en cada etapa y proceso de C-ficocianina. El proceso (1, 2, 3) y las etapas (A, B, C, D)	49
Tabla 10	Evaluación de la cantidad en cada proceso (1, 2, 3) y las etapas (A, B, C, D) de la purificación de C-ficocianina	49
Tabla 11	Evaluación de purificación de cada etapa del proceso 3 de las muestras de <i>Spirulina</i>	51
Tabla 12	Evaluación de la concentración en cada una de las etapas del proceso 3 en las muestras de la <i>Spirulina</i>	51
Tabla 13	Evaluación de recuperación en porcentaje de cada una de las etapas del proceso 3 en las muestras de la <i>Spirulina</i>	51
Tabla 14	Constante de partición de las cinco muestras de <i>Spirulina</i>	52
Tabla 15	Curva patrón de Trolox	56

1. INTRODUCCIÓN

La *Spirulina maxima* es una cianobacteria microscópica filamentosa que a lo largo de la historia se ha empleado como alimento. Al respecto existen crónicas en la literatura de México de que esta cianobacteria formó parte de la dieta cotidiana de la civilización Azteca, hace 400 años. La *Spirulina maxima* ha sido comercializada desde hace más de 20 años en la industria de los alimentos, por su alto contenido de proteínas así como constituyente de vitaminas, especialmente vitamina B12, provitamina A (β -Caroteno), minerales como el hierro, calcio y también el gran contenido de ficobiliproteínas como ficocianinas (C-ficocianina y aloficocianina).

Las ficobiliproteínas (PBPS) son macromoléculas con grupos prostéticos tetrapirrólicos (bilinas) enlazados a la cadena de la apoproteína. Las biliproteínas se pueden clasificar, atendiendo a sus características espectroscópicas, en tres grupos principales: 1).- C-ficocianinas (C-PC), 2).- ficoeritrinas (PE) y 3).- aloficocianinas (APC). La C-ficocianina es un pigmento de color azul rey, es principalmente componente de la familia ficobiliproteína. La principal aplicación de las biliproteínas se debe a su aplicación como marcadores fluorescentes de células, macromoléculas en investigación biomédica y técnicas fluorescentes altamente sensibles. La razón principal del poder antioxidante reside en la estructura lineal de los tetrapirroles que conforman la ficocianina, grupo prostético llamado comúnmente como "bilinas" que le confiere la capacidad de atrapar las especies reactivas del oxígeno (ERO) y la molécula puede actuar como un antioxidante. Las ERO incluyen iones oxígeno, radicales libres y peróxidos orgánicos e inorgánicos. Estos radicales libres son pequeñas moléculas altamente reactivas debido a la presencia de la capa de valencia no apareada que puede resultar en daños significativos a las estructuras celulares y obstaculizar varios procesos metabólicos. Es por estas razones que a la ficocianina se le atribuyen las propiedades de secuestrante de radicales, antioxidante, neuroprotectora, antiinflamatoria, anticancerígena, hepatoprotectora, entre otras.

La ficocianina es un producto especializado, diferenciado y de alto valor en el mercado. Se vende a precios muy elevados, alcanzando precios de 15,000.00 dólares el kilogramo. Las metodologías convencionales para la purificación de biliproteínas, constan de múltiples

operaciones unitarias y cada etapa afecta a la economía del proceso y produce la correspondiente disminución del rendimiento y de recuperación global.

El objetivo de este trabajo fue la de optimizar un proceso para la purificación de C-PC producida por la *Spirulina maxima*. En la evaluación del efecto de los métodos de ruptura celular sobre la liberación de las proteínas intracelulares de la *Spirulina maxima*, se demostró que cuando se emplea un regulador de fosfatos a un pH 7 con tres ciclos de congelación-descongelación más agitación constante, es superior a las demás metodologías presentadas. El proceso de un sistema de dos fases acuosas (ATPS) con polietilenglicol (PEG)/fosfatos seguido de una ultrafiltración permitió recuperar la C-ficocianina con un rendimiento de 57 % y una pureza de 3.9. Se realizó la caracterización de la C-PC por medio de electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) identificando dos bandas α y β además, obteniendo los pesos moleculares por medio de una curva patrón de pesos estándares en Kilodalton (KDa) con un peso molecular 19.5 y 17.2 KDa respectivamente. A su vez se determinó su actividad de antioxidante por el método de ABTS, obteniéndose una inhibición de 11 % y una concentración de 0.68 μg de Trolox.

Los resultados de este estudio demuestran los beneficios de la aplicación práctica del ATPS para el desarrollo de un proceso que permita la purificación de la C-ficocianina en *Spirulina maxima* en solo tres pasos.

2. ANTECEDENTES

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CIANOBACTERIAS

Los microorganismos fotosintéticos se agrupan en dos categorías: bacterias fotosintéticas y microalgas. Las primeras realizan fotosíntesis anaeróbica y poseen bacterioclorofila, químicamente diferente de la clorofila *a* presente en los otros organismos fotosintéticos (algas y plantas superiores). Las "algas verde-azules" ocupan una posición intermedia entre estas bacterias y las algas eucariotas; no poseen bacterioclorofila, sino clorofila *a*, y realizan fotosíntesis aeróbica. Sin embargo, su estructura celular procariota las sitúa taxonómicamente dentro del grupo de las bacterias (Reino Procariote), con la denominación de cianobacterias (Betancourt, 1997). En 1962 se estableció una distinción con claridad entre procariotas y eucariotas. La diferencia principal se basa en la presencia de organelos celulares envueltos por una membrana fosfolipídica en eucariontes. Stanier y Van Neil en 1969 incorporan las "algas verde-azules" en el reino procariota y propusieron llamar cianobacterias a estos microorganismos. Esta designación fue aceptada y publicada en 1974 en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Guglielmi, 1993; Sánchez y col., 2003).

Las cianobacterias son microorganismo foto-autótrofos. Son los únicos procariotas foto-autótrofos que llevan a cabo fotosíntesis aeróbica con dos fotosistemas, proceso que se asemeja a la que realizan en las plantas. Esta diferencia entre el proceso fotosintético realizado por las cianobacterias y plantas superiores radica en los cloroplastos.

Las cianobacterias tienen una estructura membranosa llamadas tilacoides, el cual proporciona el sitio tanto para la fotosíntesis y la respiración. En ellos están concentrados los pigmentos fotosintéticos activos y ligados a estructuras especiales (Whitton y Potts, 2000). En los tilacoides se encuentran estructuras importantes supramoléculas como proteínas (conocidas como ficobilisomas), clorofila *a*, complejos de proteínas, carotenoides, centro de reacción fotosintética y el electrón sistema de transporte de las cianobacterias.

Algunas fuentes afirman que las cianobacterias se encuentran en la tierra desde hace 3500 millones de años, por otra parte Schopf y Walter en 1982 han llamado al paleozoico (2500-

570 m.d.a) “La era de las cianobacterias” ya que de este periodo datan la mayor cantidad de restos fósiles de estos organismos (Ramírez y Olvera, 2006).

La diversidad morfológica de las cianobacterias es considerable, se conocen tanto formas unicelulares como filamentosas y ocurre gran variación entre estos tipos morfológicos. Las cianobacterias tienen una fisiología versátil y una amplia tolerancia ecológica. Son comunes en todos los nichos naturales y la mayoría son especies cosmopolitas, con una amplia distribución.

Además de ser autótrofos fotosintéticos, las cianobacterias tienen características microbianas, tales como una alta tasa de crecimiento, un alto contenido proteico y un metabolismo variable que responde rápidamente a los cambios en las condiciones ambientales, características de considerable valor en biotecnología. De esta forma, además de los cultivos extensivos de la cianobacteria del género *Spirulina* y de otras microalgas que se han desarrollado durante años, principalmente en el sudeste asiático (Whitton y Potts, 2000).

2.1.2. Parámetros fisicoquímicos de crecimiento de cianobacterias

En el ambiente natural las microalgas y cianobacterias son capaces de crecer bajo requerimientos mínimos y en diversas condiciones, lo cual explica su amplia diversidad de hábitat. No obstante, para lograr un cultivo masivo de cianobacterias y microalgas en crecimiento activo es necesario un inóculo viable de tamaño mínimo, suministro de nutrientes y microelementos (Betancourt, 1997; Ciferri, 1983).

Para un crecimiento óptimo, el cultivo debe contener los nutrientes necesarios y en las cantidades adecuadas. Los elementos necesarios para el crecimiento de cianobacterias y microalgas pueden clasificarse en función de la cantidad en que son requeridos. Los macronutrientes son los elementos que forman parte de las moléculas estructurales; C^{+4} , H^+ , O_2 , N_2 , S_8 , P^{-3} y en función de la especie, también pueden incluirse el Mg^{+2} , Ca^{+2} y K^+ . Los micronutrientes se requieren en concentraciones en el medio de $\mu g L^{-1}$ o menores y forman parte de moléculas esenciales como factores de crecimiento o bien son necesarios como

cofactores de enzimas: Fe^{+2} , B^{+3} , Mn^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mo^{+4} , Co^{+2} y vitaminas. Además, en la formulación de un medio de cultivo, no sólo son importantes las cantidades totales de nutrientes, sino también las proporciones entre ellos.

No obstante, para lograr un cultivo masivo de cianobacterias y microalgas en crecimiento activo es necesario un inóculo viable de tamaño mínimo, suministro de nutrientes y microelementos, adecuadas condiciones fisicoquímicas (temperatura, pH, salinidad, etc.) y luz como fuente de energía (Betancourt, 1997).

La luz constituye un factor fundamental en todo cultivo masivo de cianobacterias y microalgas, tanto por sí misma como por sus interrelaciones con otros parámetros. La radiación fotosintéticamente activa cae dentro del espectro visible (400-700 nm). Representa la fuente de energía para la fotosíntesis y, por tanto, la intensidad luminosa, la longitud de onda y el fotoperiodo, que marca el mecanismo para muchos ritmos circadianos, afectan al crecimiento y metabolismo de estas especies (Darley, 1982).

La temperatura es un parámetro físico, fundamental para el crecimiento de las microalgas y cianobacterias. La temperatura óptima para el crecimiento de la mayoría de las microalgas se sitúa entre 18 y 25 °C (Ciferri, 1983). Sin embargo, el intervalo de temperatura adecuado para el crecimiento de las cianobacterias es mucho más amplio que para las restantes especies microalgales.

La salinidad es otro de los parámetros a tener en cuenta, ya que puede afectar el crecimiento de las microalgas y cianobacterias en cultivo o bien en función de su actividad osmótica o de su composición elemental. La célula de estos organismos se encuentra separada del medio por una membrana plasmática libremente permeable al agua pero no a los solutos; en respuesta a salinidades altas, debe equilibrar su presión osmótica con el exterior aumentando la síntesis de solutos o la incorporación de éstos del medio circundante. Aparte de esta respuesta osmorregulatoria, la adaptación a salinidades altas implica algunos cambios fisiológicos, tales como la pérdida de la actividad fotosintética. Generalmente, las salinidades altas no son favorables para el crecimiento de las cianobacterias.

El pH es otro de los factores importantes en el cultivo masivo de las especies microalgales y de cianobacterias, pues determina la solubilidad del CO₂ y de los minerales, así como la distribución relativa de las formas inorgánicas de carbono (CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻ y CO₃⁻²) e influye directa o indirectamente en su metabolismo. Cada especie tiene un óptimo de pH para su cultivo; un descenso de éste suele ser letal; en cambio suelen soportar mejor los incrementos del pH (Betancourt, 1997).

Satisfechos los requerimientos nutritivos y en condiciones ambientales adecuadas, la agitación constituye el requisito más importante para la obtención de altos rendimientos de biomasa de cianobacterias y microalgas, dado que implica una serie de efectos positivos, tales como mejorar la distribución de nutrientes y luz a las células en cultivo, y evitar que éstas se depositen en el fondo del recipiente de cultivo, produciendo además una estimulación general del metabolismo celular. Otro factor importante para iniciar un cultivo masivo es la densidad inicial óptima o tamaño de inóculo. Concentraciones demasiado bajas pueden perderse por foto oxidación u otras causas, mientras que si son demasiado altas se producen pérdidas provocadas por la respiración o una ineficiente utilización de la energía luminosa, debido al propio ensombrecimiento. Su cultivo sin necesidad de utilizar sustrato orgánico puede ser económicamente ventajoso sobre otros microorganismos (Betancourt, 1997; Vonshak, 2000).

2.1.3. Importancia de las cianobacterias en el ambiente

Las cianobacterias juegan un papel importante papel en los procesos biológicos en el planeta ya que junto con las microalgas realizan el 50 % de la fotosíntesis, producto de la cual se libera una gran cantidad de oxígeno al ambiente favoreciendo procesos aeróbicos. Estos organismo son componentes del fitoplancton en cuerpos de agua dulce y marinos, se encuentran también en ríos, lagos o como componentes del bentos, sobre piedras o plantas sumergidas, en el mar se localizan en la zona intermareal rocosa, estuarios, marismas y manglares; son capaces de habitar ambientes extremos como corrientes geotérmicas, cálidas, alcalinas o neutras, lagos salinos y en desiertos dentro de pozas salinas o de agua

dulce, también se pueden encontrar en rocas, troncos y suelo que se encuentran en la tierra requiriendo una humedad constante. Algunas tienen la capacidad de fijación de nitrógeno formando simbiosis con líquenes, briofitas, helechos acuáticos, plantas superiores (Martínez, 2008).

El uso de estas especies en biotecnología se justifica por las importantes ventajas que les confiere la diversidad y la combinación de características de plantas y microorganismos presentes en las microalgas y cianobacterias. El grado de diversidad se manifiesta en sus hábitats, tamaños y niveles de organización, ciclo de vida, pigmentos fotosintéticos y su metabolismo. Los cuales los metabolitos secundarios más importante en la aplicación biotecnológica son los expolisacáridos, las ficobiliproteínas, los carotenoides, los ácidos grasos, proteínas y vitaminas; se ha usado como fuente nutricional para animales y humanos, en la industria cosmética, farmacológico y como biofertilizante, también se han empleado en el tratamiento de aguas residuales como adsorbentes de metales pesados lo cual demuestra la amplia gama de aplicaciones que tienen en beneficio de la humanidad y el ambiental con un gran valor económico (Ramírez y Olvera, 2006).

En la actualidad, existe un interés creciente en el desarrollo de técnicas eficientes de cultivo de microalgas y cianobacterias, debido a que estos microorganismos constituyen una fuente de sustancias de uso industrial y farmacológico de ahí su importancia.

Actualmente el mercado de las cianobacterias y microalgas con fines comerciales es dominada por cuatro especies que son: *Arthrospira*, *Chlorella*, *Dunaliella salina* y *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA) (Sekar y Chamdramohan, 2008).

2.2. *Spirulina maxima* (*Arthrospira*)

Spirulina que actualmente se clasifica dentro del género *Arthrospira* (Tabla 1) fue redescubierta a mediados de los 60's. Es una cianobacteria, filamentosa no diferenciada, multicelulares, cuyas células cilíndricas tienen un ancho de 3 a 12 μm sus tricomas (filamentos) tienen un patrón de arreglo en forma de hélice abierta y llega a medir 100 a 200 μm y el diámetro de la misma mide 20 a 100 μm . La *Spirulina* ha sido ampliamente

utilizado para referirse indistintamente a dos géneros, *Arthrospira* Stinzenberger 1852 y *Spirulina* Turpin 1829 así como dos especies *S. plantensis* Geitler 1932 y *S. maxima* Geitler 1925, las que tienen importancia económica, ya que son cultivadas y vendidas para la elaboración de una gran cantidad de productos a las que se le atribuyen propiedades nutritivas (Ramírez y Olvera, 2006).

Tabla 1. Clasificación científica de la *Spirulina máxima*.

Dominio	Bacteria
División	Cianobacteria
Clase	Croobacteria
Orden	Oscillatoriales
Familia	Phormidiaceae
Genero	<i>Arthrospira</i>
Especie	<i>maxima</i>

El nombre de *Spirulina* se deriva del latín de la palabra "espiral o hélice", que se refiere a su configuración física (Figura 1). La *Spirulina* es un alga microscópica azul-verde y constituye un alimento concentrado natural. Crece en la Tierra desde hace tres mil millones de años. La división celular se realiza por fisión binaria. Según los botánicos es una microalga debido a la presencia de clorofila *a* al igual que la plantas superiores. Pertenece a la división de cianofita y la clase Cianoficea, pero según bacteriólogos es una bacteria debido a su estructura procarionte (Whitton, 1992).

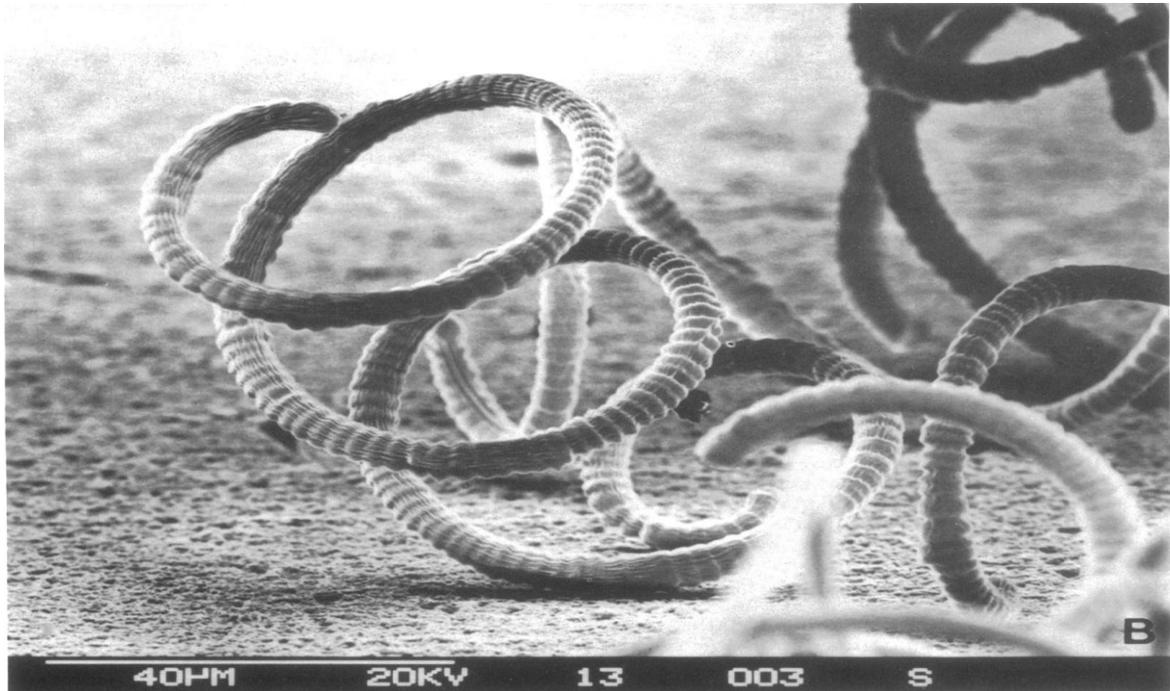


Figura 1. Micrografía electrónica de la *Spirulina máxima*. (Ciferri 1983).

La mayoría de las especies del género *Arthrospira* se han encontrado habitando cuerpos de agua alcalinos, donde crecen de forma masiva. Sin embargo, algunas se encuentran presentes en cuerpos de agua dulce como ríos, manantiales y estanques, y aunque no hay reportes para el ambiente marino, con un adecuado suplemento de HCO_3^- , N_2 y K^+ en conjunto con pH y salinidad adecuados (Vonshak y Belay, 2000).

Como producto de los análisis que se han hecho sobre la composición bioquímica de *Arthrospira*, se ha determinado que contiene proteínas, vitaminas, ácidos grasos, minerales, carbohidratos, ácidos nucleicos y pigmentos (Tabla 2) (Ramírez y Olvera, 2006).

Tabla 2. Composición Bioquímica de *Arthrospira*.

Compuesto	Contenido en %*	Compuesto	Contenido en %*
Aminoácidos		Sodio	0.45-0.5
Leucina	5.9-6.5	Fósforo	0.3-0.7
Valina	7.5	Calcio	0.1-0.4
Isoleucina	6.8	Magnesio	0.1-0.2
Lisina	2.6-3.3	Fierro	0.03-0.05
Fenilalanina	2.6-3.3	Manganeso	0.005
Metionina	1.3-2.0	Zinc	0.003
Triptófano	1.0-1.6	Cobre	0.0012
Tirosina	2.6-3.3	Cromo	0.28 mg
Ácido glutámico	7.3-9.5	Carbohidratos	
Ácido aspártico	5.2-6.0	Glicerol	7.4
Cisteína	0.5-0.7	Glucosa	7.5
Vitaminas		Ramnosa	17.1
Provitamina A	0.11-0.2	Fucosa	3.3
Tiamina B1	3-4 mg	Ribosa	8.1
Riboflavina B2	2.5-3.5 mg	Xilosa	4.5
Niacina B3	0.014	Manosa	1.9
Vitamina B6	0.5-0.7 mg	Galactosa	8.2
Cobalamina B12	0.15-0.25 mg	D-Glucosamina	2.12
Vitamina E	5-7 mg	No identificados	2.6
Vitamina K	2.2 mg	Pigmentos	6*
Ácido fólico	4.5 mg	Clorofila <i>a</i>	0.8-1.5
Ácido pantoténico	0.5-0.8 mg	Carotenoides	0.648
Biotina	5µg	β-caroteno	15
Ácidos grasos		Equinenona	11-13
Ácido mirístico	0.23	b-criptoxatina	6-8
Ácido palmítico	44.6-54.1	3-hidroxi equineona	7-11
Ácido palmitoleico	1.26	Zeaxantina	25
Ácido γ-linoleico	8-32	Diatoxantina	5
Ácido linoleico	11-31	Cantaxantina	5
Ácido oleico	1-15.5	Mixoxantofila	13-17
Otros	20.88	oscillanxantina	3-5
Minerales		No identificados	3-4
Potasio	1-14	Ficocianina	16-20

*% en base al peso seco de la biomasa. Modificado de Sánchez (2003).

2.2.1. Antecedentes históricos de la *Spirulina maxima*

Los aztecas, los mayas y las tribus nativas de la región del lago de Chad, en África, conocían hace siglos la *Spirulina* y la utilizaban diariamente como alimento. Los antiguos habitantes de Tenochtitlán, hoy ciudad de México, lograron mantener sana a numerosa población a través de una dieta equilibrada, basada en el maíz (que representaba el 80% de su dieta diaria), frijol, calabaza, jitomate, chile, chíca, amaranto y *tecuítlatl* (Paniagua y col., 2004). De acuerdo a la crónica de Francisco Hernández y Fray Toribio de Benavente en algunos sitios del vaso del Valle de México, en cierta época del año los aztecas colectaban una especie de lodo muy fino de color azul, el cual le daban el nombre de *tecuítlatl*, nombre en náhuatl que significaba “excremento de piedra”, hasta que sus acales o canoas se llenaban. Sobre la tierra o la arena de las cercanías, lo ponían a secar al sol y una vez seco le daban forma de tortas pequeñas y lo ponían sobre hierbas frescas y también lo utilizaban para condimentar el maíz en lugar de la sal (Figura 2) (Ortega y col. 1994).



Figura 2. A).- Cosechaban de la *Spirulina* por los aztecas (mexicas). B).- Mostrado en el códice de Florentino.

En la revista de la Sociedad Lineana de Bordeaux se publicó en 1940 la investigación realizada por el ficólogo francés Dangeard sobre una sustancia llamada *dihé*, consumida por el pueblo de Kanem (Abdulgader y col., 2000), 25 años más tarde al botánico Léonard, miembro de la expedición belga que recorrió el Sahara desde el Atlántico hasta el Mar Rojo, le llama la atención la abundancia de una microalga fácil de cosechar con una red bajo la forma de un puré y propone que esta alga es una especie vecina o de la misma especie que la que se vende en galletas en la región del Lago de Chad. Estas galletas o bizcochos fueron analizados y se descubrió que esencialmente contenían a la cianobacteria *S. platensis* (*A. platensis*) y que en efecto era el mismo organismo que el de las muestras colectadas por Léonard (Ramírez y Olvera, 2006).

En 1976, Delpeuch y sus colaboradores de la Oficina de Investigación Científica y Tecnológica Ultramarina de París (ORSTOM, por sus siglas en francés), llevaron a cabo una investigación sobre la importancia nutricional y económica del *dihé* para las poblaciones de Kanem y en el Lago en Chad. En 1991 Delisle y colaboradores hicieron mención sobre el consumo de *Spirulina* por los *Kanembous* en un estudio sobre el consumo y valor nutricional de la comida casera en los valles de Chad (Abdulgader y col., 2000).

Por lo anterior es claro que los *Kanembous*, habitantes de Kanem, del norte de Chad, consumen y venden desde hace mucho tiempo esta cianobacteria en forma de estos bizcochos que reciben el nombre de *dihé* ("madre de la salsa") y representan la fuente de la que obtienen la mayor cantidad de proteína (Ciferri, 1983).

Poco tiempo después del redescubrimiento del *dihé*, Clément y sus colaboradores del Instituto Francés del Petróleo (IFP), que buscaban el preciado combustible en África Central, se interesaron en el aprovechamiento de esta cianobacteria pues como observaron los científicos belgas, los *Kanembous* son personas con buen estado físico, sanos, altos y sobre todo, grandes corredores. Actualmente los *Kanembous* siguen utilizando la *Spirulina* como fuente de alimento (Cifuentes y col., 2005).

En México, después de la conquista, el uso del *tecuítlatl* cayó en el olvido. Sin embargo, en 1967 la compañía Sosa-Textcoco, S.A. observó que esta cianobacteria crecía en grandes cantidades. Donde haciendo esfuerzo con el IFP, llevaron a cabo estudios y experimentos

encaminados al aprovechamiento industrial del *tecuítlatl*, el cual se identificó como *Spirulina maxima* (Ramírez y Olvera, 2006). Es por este motivo que en 1973 se desarrolló la instalación de una planta piloto semindustrial en las orillas del caracol del lago de Texcoco, con una capacidad de producción de una tonelada diaria de alga seca. Para 1978, se había proyectado ya una capacidad de cinco toneladas. Con esa producción, Sosa Texcoco, S.A., encabezaba la lista mundial en la fabricación de este producto. Sin embargo a principios de la década de los 80, Sosa Texcoco cerró por problemas políticos y laborales y la producción de *Spirulina* fue abandonada (Figura 3) (Ciferri, 1983; Ramírez y Olvera, 2006).



Figura 3. Planta de producción de *Spirulina maxima* en la laguna Texcoco, México. (Foto cortesía de SosaTexcoco).

2.2.2. Importancia y aplicación actual de la *Spirulina maxima*

El valor de la *Spirulina* radica precisamente en la gran variedad de macronutrientes y micronutrientes que contiene, algunos de los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo humano, así como en algunas de sus propiedades, tales como incrementar los niveles de energía, reducir el estrés premenstrual, mejorar el apetito y ofrecer protección antioxidante. Actualmente se emplea cada vez más como fuentes naturales, vitaminas y

ácidos grasos, así como para la obtención de aditivos utilizados en fórmulas farmacéuticas y alimentos (Ramírez y Olvera, 2006).

Esta cianobacteria es fuente rica en proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales y otros nutrientes, por lo que uno de sus principales usos es como suplemento alimenticio, ya sea en polvo, encapsulado, en tabletas, como sustituto de harina (en diferentes sabores), en pastas para sopa, botanas, salsas, barras de granola, golosinas o bebidas instantáneas de frutas o vegetales (Figura 4) (Sánchez y col., 2003).



Figura 4. Productos comerciales de la *Spirulina* en diferentes presentaciones.

En los países en vías de desarrollo, la desnutrición representa un grave problema, por lo que la producción de fuentes alternativas de alimento es de suma importancia (Ramírez y Olvera, 2006). La *Spirulina* representa una de las alternativas, pues además de sus propiedades nutritivas, su cultivo tiene pocas dificultades ya que crece en aguas altamente alcalinas y por ello la probabilidad de contaminación con otros microorganismos es limitada; su pared celular es delgada, formada por mucopolímeros y polisacáridos, y no posee celulosa, lo que facilita su digestión, en contraposición a las algas verdes como *Chlorella sp.* Al cosecharla no se requieren de grandes esfuerzos y, finalmente, estudios de toxicidad revelan que es inocua (Chamorro y col. 1996), pudiéndose utilizar como suplemento alimenticio para humanos y animales (Labs. Almar, 2004).

Por otro lado, en los últimos años se han hecho diferentes estudios acerca de los efectos que *Spirulina* tienen sobre algunos roedores y el humano. Algunos de estos efectos son la

immuno-regulación, antioxidantes, anti-cancerígenos, antivirales, antitóxicos, antihiperlipidémicos y antihiperglucémicos. Se ha comprobado a nivel experimental, *in vivo* e *in vitro*, su efectividad en el tratamiento de algunos tipos de alergias, anemia y leucemia (Chamorro y col., 1996).

Varias de las propiedades antes mencionadas se deben a algunos de los constituyentes de la *Spirulina*, polisacáridos ω -3 y ω -6, el β -caroteno, α -tocoferol, ficocianina, compuestos fenólicos y un complejo aislado recientemente, el Ca-Spirulan (Ca-SP) que tienen actividad antiviral (Ramírez y Olvera, 2006).

2.2.3. Compañías productoras

La *Spirulina* crece en medio de cultivo líquido como: el medio Vonshak, AO, Zarrouk es frecuentemente usado en el aislamiento del proceso y el medio SSM es preferido en la etapa de producción en la industria.



A



B

Figura 5. Cultivo de *Spirulina*. A).- Cultivo en sistemas abiertos. B).- Fotorreactor.

Las principales compañías productoras de *Spirulina* se localizan en el continente asiático y europeo a nivel mundial (Tabla 3), donde el cultivo de esta cianobacteria se lleva a cabo de manera intensiva dentro de estanques artificiales o en fotorreactores (Figura 5). La producción oscila entre 13 y 450 toneladas de biomasa al año (Sánchez y col. 2003).

Tabla 3. Algunos productores comerciales de *Spirulina*.

Nombre de la compañía	Localización	Área total	Producción (ton)	Productos
Earthrise Faems	Calipatria, California, USA	150.000m ²	1995: 360 1996:400 2002:450	Spirulina PacificsTM, con alto contenido de proteínas y β-caroteno
Myanma Microalgae Biotechnology Project	Yangon Myanmar	130.00 m ²	1995: 32 1996:40	Principalmente comprimidos de <i>Spirulina</i> que se vende localmente
Cyanotech Corporation	Kailua Kona, Hawái, USA	100.00 m ²	1995: 250 1996:300	<i>Spirulina</i> pulverizada, tabletas, alimentos Formulados
Hainan DIC Microalgae Co., Ltd	China	B 100.000m ²	b2002:330	Polvo, comprimidos y capsulas, alimento formulado para consumo humano, para molusco y crustáceos
Ballarpur Industries Ltd	Nanjangud, Mysore District. India	54.000m ²	1994-1995:25 1995-1996: 85	95% polvo de <i>Spirulina</i> 5% comprimidos
Nao Pao Resins Chemical Co., Ltd	Tainan, Taiwan, ROC	A 50.000m ²	1995: 70 1996:80 2002:150	Polvo de <i>Spirulina</i> y comprimidos para consumo humana.
Neotech Food Co., Ltd	Banpong, Rajburi, Thailand	50.000m ²	1995: 30 1996:40	<i>Spirulina</i> en polvo,30% para consumo humano 70% para animal
Hainan-Dic Microalgae Co., Ltd	India		2002: 330	<i>Spirulina</i> , pulverizadas, tabletas y alimentos formulados.
Genix	Cuba	45.000m ²	2001:100	Suplementos nutricionales y cosméticos.
Siam Algae Co., Ltd.	Thailand	45.000m ²	2002:135	<i>Spirulina</i> pulverizada, tabletas, alimentos formulados.
Solarium Biotechnology	La Huayca, Chile	24.000m ²	2000:(oct-Dic):4.5 2001: 28.6 2002(Ene-Oct):13	<i>Spirulina</i> fresca, seca y pulverizada.

Modificado de Vonshak, 2000 y Sánchez 2003.

2.2.4. Moléculas de alto valor agregado

Como ya se mencionó la *Spirulina* es generalmente utilizada para satisfacer necesidades nutricionales humanas y animales, sin embargo se puede obtener moléculas puras y de alto valor agregado cuando la concentración de ésta es suficientemente alta en estos organismos, tal es el caso de los ácidos grasos poliinsaturados como el γ -linoleico (GLA), α -tocoferol, compuestos fenólicos y el Ca-SP que tiene actividad antiviral (Ramírez y Olvera, 2006).

Los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales solubles en lípidos. Son los responsables de una amplia variedad de colores vistosos en la naturaleza, los más conspicuos siendo el amarillo, el naranja y el rojo (Sánchez y col. 2003).

El β -caroteno es un constituyente común de la fracción carotenoide de la *Spirulina* y de otras algas, estando en mayor concentración en las algas verdes.

Otras de las moléculas de alto valor agregado son las ficobiliproteínas (PBPS) (*Phicobiliproteins* por sus siglas en el idioma inglés).

2.2.5. Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas forman parte de los ficobilisomas, los cuales son unos complejos antena captadores de luz en el proceso fotosintéticos más importantes en las cianobacterias, las algas rojas y un grupo conocido como criptomonadas. Se aíslan fácilmente como complejos pigmento-proteína, solubles en agua e intensamente fluorescentes (Betancourt, 1997) y representan el constituyente bioquímico fundamental de aquellos organismos en los cuales se encuentran; su función primaria *in vivo* es como pigmento-proteína captador de la energía lumínica (Glazer, 1989).

Las ficobiliproteínas además de su función primaria en la fotosíntesis, pueden servir como reserva de nitrógeno celular. Bajo condiciones de limitación de nitrógeno en la célula, las ficobiliproteínas son degradadas y utilizadas para la síntesis de otras proteínas esenciales y

constituyentes celulares nitrogenados, reapareciendo de nuevo cuando la disponibilidad de nitrógeno es adecuada (Betancourt, 1997).

Las ficobiliproteínas absorben energía en la región visible del espectro (400-700 nm). Con base a su coloración y espectro de absorción se clasifican en tres clases: 1).- aloficocianina (verde-azulado), 2).- C-ficocianina (azul tornasol) y 3).- ficoeritrina (púrpura). Las ficobiliproteínas tienen un espectro de absorción en la región visible debido a la presencia de cromóforos formados por una cadena abierta de tetrapirroles, llamada ficobilina. Los máximos de absorción son 650-655 nm APC, 615-640 nm PC y 565-575 nm PE, emiten luz a 660 nm, 637 nm, y 577 nm, respectivamente (Glazer, 1989). La absorbancia máxima de cada ficobiliproteína es una característica que permite determinar el grado de pureza de cada ficobiliproteína a través de la relación de pureza. Esta relación de pureza es el resultado del cociente entre la absorbancia máxima del cromóforo y la absorbancia de la parte proteica a 280 nm ($R_{A \text{ cromóforo}} / A_{\text{proteína}}$) (Santos y col., 2004).

Existen reportes en los que mencionan que todas las ficobiliproteínas tienen una estructura tridimensional muy similar, tienen 2 subunidades llamadas α y β , las cuales presentan afinidad entre ellas y están asociadas en protómeros ($\alpha\beta$), los que a su vez pueden agregarse en trímeros ($(\alpha\beta)_3$), y hexámeros ($(\alpha\beta)_6$). Se ha demostrado que la subunidad α está presente un cromóforo y la subunidad β presenta dos cromóforos por lo que el peso molecular de cada subunidad concuerda con cada subunidad presente. Sus pesos moleculares difieren con el organismo, pero los polipéptidos α son comúnmente más pequeños que los β (Gantt, 1981).

2.2.6. Estructura y organización de las ficobiliproteínas

Individualmente las ficobiliproteínas tienen una estructura, un núcleo conocida como apoproteína, con cromóforos unidos a ella. Los tipos de cromóforos adheridos a la apoproteína y la forma en que ambos se enlazan determinan el color y las características de absorción de la ficobiliproteína (Gantt, 1981). Existen cuatro tipos de cromóforos en la familia de las ficobiliproteínas, que suelen denominarse como ficobilinas, y dos de los más frecuentemente encontrados en las ficoeritrinas, en las ficocianinas y en las aloficocianinas son los isómeros ficoeritrobilina y ficocianobilina (Betancourt, 1997).

Las ficobiliproteínas son pigmentos, macromoléculas componentes del aparato fotosintético y consisten en proteínas unidas covalentemente a las ficobilinas (Ramírez y Olvera, 2006). Las ficobilinas son tetrapirroles de cadena abierta y relacionados estructuralmente a las clorofilas, están unidas a una proteína por un enlace denominado tioéter entre un grupo sulfuro (R-SH) de la proteína y la cadena lateral vinílico de la ficobilina (Figura 6).

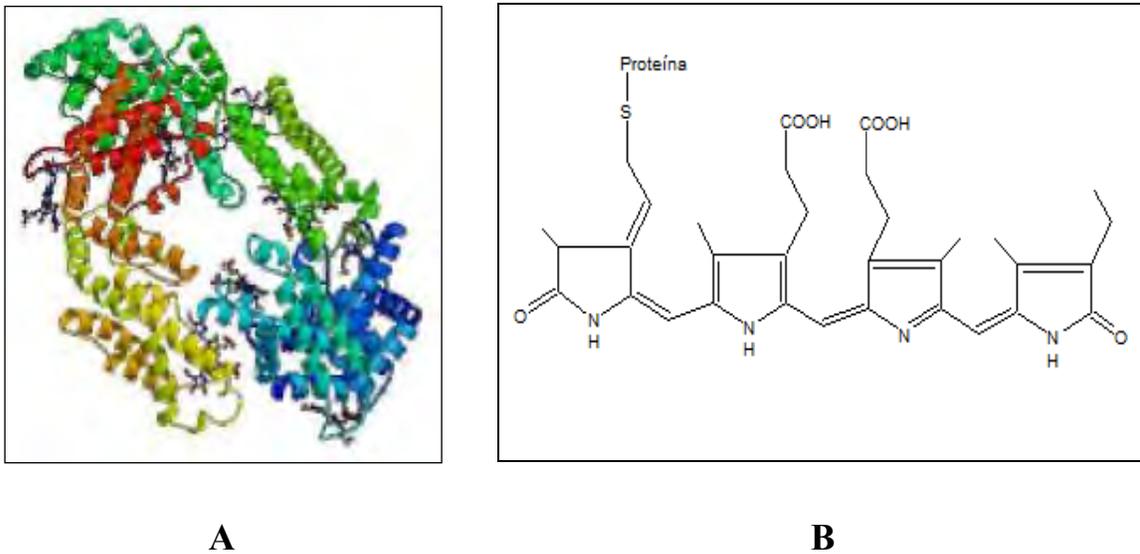


Figura 6. Estructura de la C-ficocianina. A).- Estructura tridimensional de la C-ficocianina B).- Estructura química de los tetrapirroles de cadena abierta de C-ficocianina.

Las ficobilinas participan en el proceso de fotosíntesis en forma de grandes agregados multiméricos llamados ficobilisomas, los cuales están dispuestos en varillas espaciadas regularmente en la superficie protoplasmática de la membrana tilacoidal, sirven como estructuras predominantes de luz para el crecimiento de cianobacterias; el modelo de esta disposición ha sido desarrollado después de extensos estudios bioquímicos, biofísicos y de microscopía electrónica (Figura 7) (Santos y col., 2004).



Figura 7. Modelo del ficobilisoma con el ordenamiento fundamental de las ficobiliproteínas Tomado de Gantt (1981).

Las ficobilisomas son más comúnmente en forma hemidiscooidal, las intrincadas estructuras funcionales constará de dos tipos de proteínas: Ficobiliproteínas de colores brillantes y el segundo de proteínas básicas asociadas fuertemente con otras para formar la estructura de ficobilisomas (Glazer, 1989).

En los últimos ficobilisomas la captura de energía solar y esta energía inicia por la ficoeritrina pasando por la C- ficocianina, después por aloficocianina y finalmente llega al fotosistema II (Rôgner y col., 1990).

2.2.7. Importancia biotecnológica de las ficobiliproteínas

2.2.7.1. Como colorante

Debido a la investigación con respecto a la utilidad de la ficobiliproteínas como colorante, hay una creciente demanda de colores naturales para uso en los alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos, textiles y como tintas de impresión. Sin embargo, su utilidad se limita a algunas de estas, ya que los tintes naturales tienen valores bajos de tinción y persistencia. Pero debido a los efectos tóxicos de varios colorantes sintéticos, hay una preferencia cada vez mayor para utilizar los colorantes naturales para los diferentes usos finales (Sekar y Chandramohan, 2008).

La C-ficocianina derivada de *Spirulina platensis* se utiliza como pigmento natural en alimentos como la goma de mascar, gelatinas, productos lácteos y jaleas (Santos y col.,

2004). A pesar de su baja estabilidad al calor y la luz, la C-ficocianina se considera más versátil que la gardenia y el añil, que muestra un color azul brillante.

Como cosmético la C-ficocianina debido a su solubilidad en agua se somete a un proceso químico por tratamiento con etanol. Esto incrementa la estabilidad frente al sudor y por lo tanto le confiere alta seguridad al estar en contacto con los cuerpos humanos y por ende es utilizado para sombras de ojos, delineador de ojos y labios.

Las ficobiliproteínas desempeñan un papel como reguladores del crecimiento vegetal en la horticultura de invernadero, han sido patentados los métodos, en los que se utilizan como sustancia fotoactiva que absorbe luz verde a la luz incidente y que emite la luz que tiene la longitud de onda del amarillo a la región roja (Lone y col., 2005).

La ficocianina se utiliza como material para el teñido telas, como la seda, el algodón y el rayón. Esto se debe a su color azul tornasol, característico y por sus propiedades no tóxicas ni carcinogénicas además de su solubilidad en agua (Sekar y Chandramohan, 2008).

2.2.7.2. Como agente fluorescente

Ficobiliproteínas juegan un papel importante en sistemas de detección basados en la fluorescencia, particularmente en citometría de flujo. Esto se debe a sus propiedades espectrales como: 1).- la excitación y la emisión en el extremo rojo del espectro, donde la interferencia de matrices biológicas tienden a ser menor, 2).- un gran desplazamiento de Stokes, por lo que la interferencia de dispersión Raman y Raleigh y otros componentes fluorescentes es menos importante o inexistente, 3).- la inmunidad de enfriamiento de forma natural de sustancias biológicas, 4).- una alta solubilidad en soluciones acuosas y 5).- de fluorescencia cuántica independiente, sobre todo R-ficoeritrina(R-PE) y aloficocianina (APC), han hecho reactivos dominante en esta clase de fluorocromos (Kronick y Grossman, 1983).

También se ha encontrado aplicaciones de la C-ficocianina microscopia para diagnóstico e investigación biomédicas, con ciertas ventajas sobre los métodos tradicionales de fluorescencia (Santos y Col., 2004).

2.2.7.3. Como agente farmacéutico

En la última década, la proyección de las microalgas, especialmente las cianobacterias, los antibióticos y compuestos activos en lo farmacéutico ha recibido cada vez mayor interés (Borowitzka, 1995). La razón principal de las ficobiliproteínas del poder antioxidante reside en la estructura lineal de tetrapirroles, grupo prostético llamado comúnmente como "bilinas" que le confiere la capacidad de atrapar las ERO y la molécula puede actuar como un antioxidante. Las ERO incluyen iones oxígeno, radicales libres y peróxidos orgánicos e inorgánicos. Estos radicales libres son pequeñas moléculas altamente reactivas debido a la presencia de la capa de valencia no apareada que puede resultar en daños significativos a las estructuras celulares y obstaculizar varios procesos metabólicos. Es por esta razón que a la C-ficocianina se le atribuyen las propiedades de secuestrante de radicales, antioxidante, neuroprotectora, antiinflamatoria, anticancerígena, hepatoprotectora, entre otras (Badrish y col., 2008).

Cuando se evaluó como un antioxidante *in vitro*, fue capaz de atrapar radicales alcoxilo, hidroxilo y peroxilo, e inhibe la peroxidación lipídica microsomal inducida por Fe^{+2} - ácido ascórbico o los iniciadores radicales libres 2,2'-azobis (2-amidinopropano), (AAPH). También reduce el edema, la liberación de la histamina (Hi), activa el mieloperóxido (MPO) y los niveles de prostaglandina (PGE2) y leucotrienos (LTB4) en los tejidos inflamados. La ficocianina también reduce los niveles del factor de necrosis tumoral (TNF- α) en el suero sanguíneo de los ratones tratados con endotoxina y mostraron efectos neuroprotectores en las células granulares de cerebelo de rata en cultivos celulares.

El *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA) el extracto de ficocianina se ha descrito como un potente antioxidante. Se demostró *in vitro* la participación de ficocianina en la protección antioxidante de extracto de la AFA contra el daño oxidativo. En las muestras de plasma, que inhibe el grado de oxidación de los lípidos inducida por el agente pro-oxidante cloruro de cobre ($CuCl_2$) (Sekar y Chandramohan, 2008). Estos hallazgos acerca de la ficocianina consideran los beneficios potenciales en la prevención de muchos trastornos patológicos asociados con el estrés oxidativo y la inflamación. Además, informan el efecto inhibitorio de la ficocianina de *Spirulina platensis* en el crecimiento de la leucemia humana K562 (Liu y col., 2000). La C-ficocianina obtenida de la *Spirulina platensis*, influye sobre las concentraciones de colesterol en suero lo que imparte una actividad hipocolesterolémica

más fuerte. Por otro lado, la C-ficocianina presenta efectos anti-inflamatorios y hepatoprotectores en un modelo animal con hepatitis humana, reduciendo la alanina amino transferasa (ALT), aspartato amino transferasa (AST) y malondialdehído (MDA) en suero (González y col., 2003). Asimismo, una concentración de 0.25 mg/mL de C-ficocianina influye en los parámetros hepatocelulares relacionados con el estrés oxidativo hepático y el funcionamiento de células de Kupffer, indicando que la C-ficocianina inhibe la fagocitosis de carbono y la de la inducción O₂-carbono por perfusión de hígado, dependiente de la concentración. Además se ha encontrado que la C-ficocianina suprime el 3,3,5-triyodotirina (T3) inducida, aumentado los niveles de nitrito en suero y la actividad hepática de óxido nítrico sintetasa (Sekar y Chandramohan, 2008).

2.2.8. Producción de ficobiliproteínas

Los principales productores de ficobiliproteínas (es decir, ficoeritrina y ficocianina) son la cianobacteria *Arthrospira* y de *Rhodophyta Porphyridium*. La naturaleza de las condiciones de cultivo empleadas, especialmente nitrógeno y carbono determinan el contenido de ficobiliproteínas.

Uno de los medios más profundo de análisis de la investigación es el de examinar las tendencias concurrentes en las patentes. Para analizar las potencialidades de las ficobiliproteínas, se realizó una revisión de patentes en diversas bases de datos disponibles a través de Internet de varios países: Estados Unidos de América, Europa, Japón, Corea del Sur, Nueva Zelanda, Australia, Singapur, China, Tailandia, Taiwán, Alemania, Reino Unido y Canadá, de esta búsqueda se obtuvo de manera estratégica un total de 180 patentes mediante un análisis crítico, en ésta información se pudo observar que se encuentra categorizada en tres grupos (Sekar y Chandramohan, 2008):

- 1).- Patentes sobre aplicaciones de fluorescencia basada en ficobiliproteínas.
- 2).- Patentes de las aplicaciones generales de ficobiliproteínas.
- 3).- Patentes en la producción de ficobiliproteínas.

La producción de C-ficocianina (una proteína azul) a partir de la *spirulina maxima* representa un caso muy interesante por sus aportaciones en la investigación y por su alto valor económico en el mercado se vende a precios muy elevados alcanzando precios hasta \$15,000.00 dólares el kilo. El valor comercial de C-ficocianina depende del grado de pureza grado alimentario (pureza 0.7) es aproximadamente \$0.13 USD/mg, mientras que la c-ficocianina grado reactivo (pureza 3.9) varía entre \$1 a 5 USD/mg. En contraste, el valor comercial de c-ficocianina grado analítico (pureza mayor que 4.0) puede ser superior a \$15 USD/mg (Rito y col., 2001).

2.3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS FICOBILIPROTEÍNAS

Las ficobilinas han sido extraídas de las algas y purificadas de diferentes formas, que van desde los ficobilisomas intactos hasta los cromóforos libres de proteínas. Estas formas, por definición, tienen diferentes propiedades de absorción, fluorescencia y estabilidad química por lo que es útil definir los procedimientos de purificación y la naturaleza de los productos bilínicos. El adecuado control de la fuerza iónica y del pH durante el proceso de extracción garantiza la estabilidad de la asociación del polímero y sus propiedades de fluorescencia (Sekar y Chandramohan, 2008).

En la literatura se encuentran reportadas diferentes técnicas, a través de las cuales han logrado purificar C-ficocianina a partir de *Spirulina maxima* y sus diferentes especies (Cisneros y Rito, 2005). Las metodologías convencionales para la purificación de ficobiliproteínas, constan de múltiples operaciones unitarias, y cada etapa afecta a la economía del proceso y produce la correspondiente disminución del rendimiento de recuperación global (Rito y col., 2001).

La cual involucra etapas de separación de célula, secado, molienda, después de la ruptura celular es posible separar las ficobilinas de las clorofilas y carotenoides por centrifugación del homogenizado a alta velocidad. Del sobrenadante coloreado obtenido, solo el 40% puede ser de ficobilinas, que probablemente están presentes como agregados derivados de la ruptura parcial de la estructura del ficobilisoma. Posteriormente la purificación del sobrenadante se realiza por precipitación con sulfato de amonio, diálisis, cromatografía en columna (filtración en gel, cromatografía de intercambio), y ultrafiltración.

Las similitudes químicas entre los diferentes tipos de ficobiliproteínas, hacen relativamente difícil el aislamiento de dichos pigmento-proteínas por los métodos comunes tales como la electroforesis y la cromatografía de intercambio iónico (Cisneros y Rito, 2005).

2.4. SISTEMA DE DOS FASES ACUOSAS DE PARTICIÓN

2.4.1. Introducción

El sistema de dos fases acuosas de partición ATPS (*aqueous two phase systems* por sus siglas en el idioma inglés) es una técnica que ha demostrado tener potencial para la recuperación primaria de compuestos biológicos. Los primeros estudios realizados con ATPS llevados a cabo por Albertsson en 1956 demostraron que era posible separar y recuperar componentes celulares (organelos), así como pigmentos de algas y cianobacterias utilizando dicha técnica. De los experimentos de Albertsson a la fecha se han realizado estudios acerca del comportamiento de partición celular, organelos y productos biológicos (tanto proteicos como no proteicos) en ATPS (Cortes, 2008).

El ATPS está formado por dos fases inmiscibles originadas por la mezcla de dos polímeros o de un polímero y una sal en una solución con alto contenido de agua. Al incorporar las proteínas en estos sistemas, estas moléculas mostrarán una preferencia por una u otra fase permitiendo así su separación.

La principal ventaja del uso de estos sistemas para la separación de proteínas es que en ellos se genera un ambiente inocuo para biomoléculas debido a su alto contenido de agua y baja tensión interfacial. Sin embargo, su uso en procesos de separación ha estado restringido principalmente a la escala de laboratorio, y no se ha difundido a nivel industrial debido principalmente a la falta de conocimiento sobre el mecanismo que gobierna la partición de las proteínas en el sistema. Por esta razón, resulta de utilidad el desarrollo de modelos que describan el comportamiento de estas moléculas en ATPS (Walter y col., 1985).

El comportamiento de proteínas en estos sistemas depende de muchos factores asociados a las características de los ATPS como su pH, temperatura, tipo de concentración de sales y polímeros utilizados. Además, las propiedades de las mismas proteínas también tienen un

rol en este fenómeno. Entre ellas se encuentran su peso molecular, carga e hidrofobicidad, siendo esta última una de las más relevantes (Harris y Angal, 1989).

2.4.2. Formación de dos fases

Este sistema líquido-líquido se forma al mezclar dos sustancias solubles en agua, las cuales al superar cierta concentración se vuelven inmiscibles entre sí. En el equilibrio el sistema se separa en dos fases, cada una enriquecida en uno de los componentes (Cortes, 2008).

En mezclas de polímero-polímero (polietilenglicol (PEG)-dextrano, PEG-Polivinil alcohol, etc.) cuando los polímeros se mezclan forman grandes agregados y los dos polímeros tienden a separarse debido a la exclusión estérica. Sin embargo, el uso de dichos sistemas está limitado por los costos de algunos polímeros (principalmente el dextrano). Adicionalmente, el PEG forma sistemas de dos fases acuosas cuando se mezcla con soluciones salinas concentradas (PEG-fosfato de potasio, PEG-sulfato de sodio, etc. (Walter y col., 1985).

Debido a su bajo costo y corto tiempo de separación el sistema PEG-sal se emplea frecuentemente, el sistema más utilizado y mejor caracterizado es por PEG – fosfato de potasio.

Este sistema de dos fases acuosas de partición se puede utilizar para separar las proteínas de los desechos celulares, para purificar proteínas de otras proteínas. La mayoría de la materia soluble y partículas se dividirá en la inferior, la fase más polar, mientras que las proteínas se dividirán en la fase superior, menos polar (generalmente PEG) (Harris y Angal, 1989).

Los ATPS se pueden describir mediante un diagrama de fases como el que se muestra en la (Figura 8). En este diagrama, la curva binodial marca el límite sobre el cual se forman las dos fases en los sistemas. De esta forma, sobre la curva existen dos fases y bajo ella sólo hay una. La recta AC la cual permite conocer la composición de las fases en equilibrio, van a estar en lados diferentes de la curva binodial. Estas líneas nunca se cruzan entre sí. En el diagrama de fase se puede ser interpretado por cada sistema de polímero y se utilizan para predecir el volumen y la composición de la fase superior. Todos los sistemas que tengan una composición global dentro de esta recta, tal como el punto B, en el equilibrio se

separan en dos fases descritas por los puntos A y C. Estos puntos corresponden a las composiciones de la fase inferior y superior respectivamente.

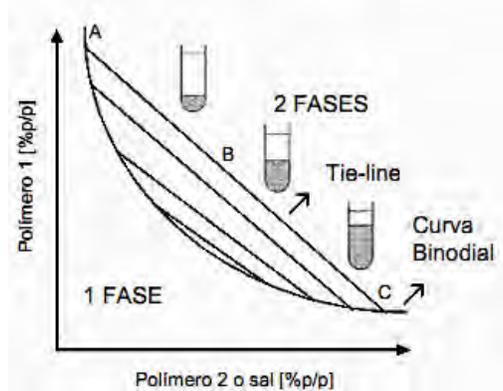


Figura 8. Diagrama de fases para un sistema de dos fases acuosas

Todos los puntos de la línea recta tienen una composición idéntica que en la parte superior de (A) y el inferior (B) de la fase (Hustedt y col., 1978).

Al incorporar una partícula en estos sistemas, como por ejemplo una proteína, ésta se distribuirá entre las dos fases. Esta partición se describe mediante el coeficiente de partición K , definido como el cociente entre las concentraciones de la partícula en la fase superior e inferior del sistema (Johansson y col., 1990).

EL coeficiente de partición (K) es definida así:

$$K = \frac{C_{Sup}}{C_{Inf}} \quad (1)$$

Donde C_{Sup} y C_{Inf} presentan la concentración de equilibrio de la partición de la proteína en las fases inferior y la superior, respectivamente. Sistemas representados por puntos de la línea recta tienen coeficientes de partición idéntica.

La cantidad de proteína extraída en la fase superior (Y_t) se determina utilizando la siguiente ecuación:

$$Y_t = \frac{100}{1 + \frac{V_{Inf}}{V_{Sup}K}} \quad (2)$$

Donde V_{Sup} y V_{Inf} son los volúmenes de la fase superior e inferior, respectivamente.

La partición de biomoléculas en ATPS depende de distintos factores, los cuales a su vez, interactúan entre sí, lo que hace difícil el modelamiento de este fenómeno.

Estas variables se dividen en factores asociados al sistema y los correspondientes a la naturaleza de la partícula en partición (Harris y Angal, 1989).

Los factores que influyen en la partición de las proteínas en un sistema de dos fases acuosas, son las siguientes:

- 1).- El polímero usado
- 2).- El peso molecular y tamaño del polímero
- 3).- Concentración del polímero
- 4).- Temperatura
- 5).- pH
- 6).- La pureza de la solución de proteína
- 7).- La fuerza iónica

En general, cuanto mayor sea el peso molecular de los polímeros menor es la concentración necesaria para la formación de dos fases y cuanto mayor sea la diferencia en el peso molecular entre los polímeros será más asimétrica la fase del diagrama. Además, cuanto más elevado sea el peso molecular del PEG, será menor el valor de la constante de partición k , y el peso molecular del dextrano no tendrá un efecto tan fuerte sobre la constante k (Harris y Angal, 1989).

Otro factor que puede afectar la partición de biomoléculas en ATPS es el uso de polímeros con polidispersividad. Esta propiedad altera la distribución de un polímero en moléculas de distinto peso molecular. Esta variable puede significar cambios en la composición de las fases de los ATPS (Johansson y col., 1990), lo que a su vez puede influenciar la partición de biomoléculas en ellos. Este es el caso del sistema de PEG/dextrano, donde se ha observado que la polidispersividad induce al fraccionamiento de las moléculas de PEG, mientras que las cadenas de alto peso molecular tienden a quedarse en la fase superior y las de menor tamaño se mantienen en la fase inferior.

El efecto de la temperatura del sistema en la partición de partículas no es claro. Se ha observado en sistemas formados por PEG y fosfato de potasio que un aumento de temperatura conduce a una alteración en la composición de las fases, llevando a un

incremento de la concentración de PEG y sal en las fases superior e inferior respectivamente y a la obtención de un coeficiente de partición más elevado (por ejemplo de la β -glucosidasa) (Cortes, 2008). Este fenómeno se atribuye a una disminución de las moléculas de agua libres para la disolución de PEG y de moléculas menos polares que la sal en la fase inferior provocada por una intensificación del efecto de alta concentración de sal.

El pH del sistema también afecta la partición de biomoléculas. Se ha observado que una diferencia de pH positiva entre las fases superior e inferior de un sistema acuoso lleva a que las moléculas con carga positiva prefieran la fase inferior y las con carga negativas la superior. De esta manera, el producto de la interacción iónica entre el sistema y los solutos cargados, moléculas negativas tendrán un constante de partición K superior que su equivalente neutro, mientras que las con carga positiva tendrán un coeficiente de partición menor. Además, cambios en el pH del sistema provocan cambios en la carga neta de las proteínas. Un pH superior al punto isoeléctrico de una proteína provocará que su carga neta sea negativa mientras que uno inferior hará que sea positiva. Así, es posible provocar cambios en la afinidad de las proteínas por las fases del sistema mediante el manejo del pH (Harris y Angal, 1989).

Con respecto a las biomoléculas incorporadas al sistema, sus propiedades fisicoquímicas tales como:

- 1).- Tamaño, la partición depende del tamaño de la molécula de proteína o de la superficie de las partículas es el factor dominante.
- 2).- Electroquímica, donde el potencial eléctrico entre la fase se utiliza para separar moléculas o partículas de acuerdo a su carga.
- 3).- Afinidad hidrofobia, donde las propiedades hidrofóbicas del sistema de fase son usadas para la separación de acuerdo con la hidrofobicidad de las proteínas.
- 4).- Afinidad bioespecífica, en los sitios de afinidad de las proteínas y ligandos unido a uno de los polímeros de fase es explotada para la separación.
- 5).- Conformación-dependiente, donde la conformación de las proteínas es el factor determinante.

Estas distintas propiedades se han relacionado con el coeficiente de partición de biomoléculas en ATPS a través de la siguiente expresión:

$$K = K_{hfob} \cdot K_{el} \cdot K_{tamaño} \cdot K_{sol} \cdot K_{af}$$

Donde K se expresa como la multiplicación de factores asociados a la hidrofobicidad (K_{hfob}), fuerzas electrostáticas (K_{el}), tamaño ($K_{tamaño}$), solubilidad (K_{sol}), y afinidad de la partícula (K_{af}) (Johansson y col., 1990).

2.4.3. Material y equipo del ATPS

Los polímeros para la formación en dos fases se enumeran en la Tabla 4, junto con sus propiedades y proveedores. En una escala de laboratorio, equipo consistirá principalmente en tubos de plástico para centrifuga graduados, una centrifuga (Harris y Angal, 1988).

Tabla 4. Polímeros que se usan en el sistema de dos fases acuosas.

Polímero	Composición	Pesos molecular	Proveedor	Precio (US Kg ⁻¹)
PEG	Polímero de etileno glicol	600-20 000 El más usado es de 4 000-8 000	Union Carbibe Corp. Sigma Aldrich	1.4-1.6
Dextrano grado técnico	Polímero de (1-6) ramificados de glucosa	500 000	Pharmacia-LKB;	80-100
Ficoll	Copolímero de sacarosa y epiclорhidrina	400 000	Pharmacia-LKB;	
Reppal PES	Hidroxipropilo derivado de almidón	100 000 o 200 00	Reppe Glykos AB	17
Aquaphase PPT	Hidroxipropilo derivado de almidón		Pertorp Biolytica AB	

2.4.4. Ventajas de ATPS

Es un excelente método para la extracción de proteínas/enzimas y otros, a partir de extractos de células o mezclas de otros.

Tienen varias ventajas, tales como alta biocompatibilidad, baja tensión superficial (lo que minimiza la degradación de las biomoléculas), alta capacidad de carga y rendimiento, y son fácilmente escalables.

La Separación de las fases y la división de los compuestos se produce rápidamente. Además son sistemas económicos y en los que se pueden manejar muchos factores para conseguir mejorar la partición de la molécula de interés (Hustedt y col., 1978).

2.4.5. Aplicación del ATPS

La aplicación práctica de los procesos que utilizan sistemas de dos fases acuosas para recuperar proteínas puede reducir los problemas de clarificación sólido-líquido y eliminación de contaminantes.

Han sido utilizados exitosamente en la recuperación y purificación de una gran variedad de productos biológicos, como por ejemplo enzimas (Shibusawa y col., 2007) virus y pseudo-partículas virales, pigmentos de naturaleza proteica y no proteica, DNA genómico y plásmidos (Frerix y col., 2007), etc. De igual manera esta técnica ha sido utilizada en el fraccionamiento de células y organelos (Nam y col., 2005). Sin embargo, a pesar de que esta técnica ha demostrado tener un gran campo de aplicación, las investigaciones realizadas se han enfocado fuertemente hacia la recuperación de proteínas, dejando a un lado los compuestos de bajo peso molecular. Actualmente existe un gran auge en el estudio de las propiedades nutraceuticas que algunos compuestos naturales de bajo peso molecular este presentan, particularmente en fitoquímica.

A pesar de las múltiples ventajas y amplio espectro de aplicación que han demostrado el ATPS, el uso de esta técnica ha sido limitado debido a la escasa información acerca de los procesos y fenómenos fisicoquímicos involucrados en el comportamiento de partición (Rito y col., 2001).

2.5. ANTIOXIDANTE

Nuestro cuerpo está constituido por billones de diminutas células hechas de miles de moléculas que contienen electrones que van por parejas. A veces, una molécula tiene un electrón sin pareja, y a eso se le llama un radical libre”. Es normal tener radicales libres en el cuerpo. Sin embargo, en condiciones de estrés o por la influencia de factores ambientales como radiaciones UV, contaminación, etc., se puede producir una formación de estos radicales libres por arriba de los niveles aceptables. La formación excesiva de estas formas provoca la peroxidación de las membranas lipídicas (particularmente los ácidos grasos poliinsaturados), la degradación de las proteínas, azúcares y del ADN. Los radicales libres están involucrados pues en los procesos de envejecimiento prematuro de la piel y en numerosas patologías como el cáncer de piel o la arterioesclerosis (Bhat y Madyastha, 2000).

Los radicales libres, sin embargo, pueden ser neutralizados con antioxidantes y éstos se encuentran de forma natural en nuestro cuerpo o entran en él a través de dietas ricas en vegetales. Sin embargo, nuestro estilo de vida actual (estrés medioambiental, malos hábitos en alimentación, etc.) puede causar en nuestro cuerpo una deficiencia de antioxidantes.

Las algas marinas, como organismos fotosintéticos, están expuestas a una combinación de luz y altas concentraciones de oxígeno, lo cual permite la formación de radicales libres y otros agentes oxidantes. Los elementos del aparato fotosintético son especialmente vulnerables al daño fotodinámico ya que los ácidos grasos poliinsaturados son importantes componentes estructurales de la membrana de los tilacoides. La ausencia de tales daños en las algas sugiere, y nos lleva a pensar, que las células de estos organismos marinos deben tener mecanismos y compuestos que previenen y protegen de la oxidación. Efectivamente, las algas marinas constituyen una fuente importante de compuestos antioxidantes y de enzimas protectoras que permiten luchar contra las especies reactivas del oxígeno formadas a partir de nuestro metabolismo (Mesa y Gaviria, 2010).

3. HIPÓTESIS

La C-ficocianina es un pigmento que se extrae de la *Spirulina maxima* y se ha reportado que debido a un excesivo número de etapas unitarias afectan el rendimiento del proceso. El uso de un sistema de dos fases acuosos (ATPS) y ultrafiltración reducirá significativamente el gran número de etapas unitarias y la eliminación de etapas de cromatografías, así se obtendrá una mayor recuperación y purificación de la proteína.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Optimizar un proceso para la purificación de C-ficocianina a partir de la *Spirulina maxima* con base en las diversas técnicas informadas en la literatura, que se adapte a nuestras infraestructura e necesidades con la finalidad de producir C-ficocianina pura para emplearla en proyectos de investigación en el área biológica.

4.2. Objetivos particulares

- 1).- Utilizar métodos de rotura celular: lisis, destrucción mecánica y congelación descongelación.
- 2).- Purificar la C-ficocianina con las técnicas de separación: ATPS, diafiltración, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de gel de filtración.
- 4).- Cuantificar la C-ficocianina por medio de un espectrofotómetro UV-Vis.
- 5).- Identificación de C-ficocianina por electroforesis en gel de poliacrilamida.
- 6).- Determinar la actividad antioxidante por medio de ABTS.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Material y reactivos

Material:

- ❖ Matraz erlenmeyer 1-4 L.
- ❖ Matraz erlenmeyer de 10 mL.
- ❖ Vasos de precipitado 25-250 mL.
- ❖ Pipeta de 5 y 10 mL.
- ❖ Micropipetas de 0.5-1000 μ L.
- ❖ Columna de cristal (1.5 x 30 cm).
- ❖ Tubos para centrifuga de 4 mL.
- ❖ Tubos para centrifuga graduados de 15 mL.
- ❖ Tubos eppendorf de 2.0 mL.
- ❖ Papel filtro de 55 mm diámetro poro medio (Millipore Corp).
- ❖ Membrana de diálisis de celulosa de 35 mm de diámetro de 12 KDa (Sigma-Aldrich).
- ❖ Membrana de Celulosa 25 mm de diámetro de 30 KDa.
- ❖ Marcador de de peso molecular Bench Mark (Introgen peso molecular de 4-10 KDa).
- ❖ Sephadex-50 fino 20-80 μ m (Sigma Aldrich).
- ❖ Dietilaminoetil-celulosa (Sigma Aldrich).
- ❖ C-PC comercial (Sigma-Aldrich).

Equipo:

- ❖ Fotoreactor de cara plana.
- ❖ Sonicador (Ultrasonicador processor).
- ❖ Espectrofotómetro UV-Vis Bio mini (Shimsdzu UV-160).
- ❖ Centrifuga Beckman Coulter (Allegra™ G4R con un rotor F3602).
- ❖ Centrifuga Beckaman (GS-GR-Centifuge).

- ❖ Amicon ultra (Millipore Corp 15 mL, 5.3 Kg/cm²).
- ❖ Equipo de electroforesis placa vertical (Bucher Instrumens mini vertical Slab).
- ❖ Fuente de poder.
- ❖ pH metro digital (termo Orion 410).
- ❖ Liofilizador Benchtop (The Virtis Company, INC. Gardiner, New York 12525, USA).
- ❖ Vortex.
- ❖ Agitador magnético.

Muestras:

- ❖ *Spirulina* cultivada seca y fresca.
- ❖ *Spirulina de Texcoco*.
- ❖ *Spirulina* AEH.
- ❖ *Spirulina* ANDES.

Reactivos:

Tabla 5. Característica de los reactivos usados.

Reactivo	Formula	Pureza %	Marca
ABTS	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₆ S ₄	95	Sigma Aldrich
Ácido acético glacial	CH ₃ COOH	99.8	Sigma Aldrich
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	99	Merck
Acrilamida	CH ₂ CHCONH ₂	99	Sigma Aldrich
azul de Coomassie R-2500	C ₄₅ H ₄₄ N ₃ O ₇ S ₂ Na	No reportada	Sigma Aldrich
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	100	J.T. Baker
Bis -acrilamida	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	95	Sigma Aldrich
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ .2 H ₂ O	99	J.T. Baker
Cloruro de manganeso tetrahidratado	MnCl ₂ .4 H ₂ O	99	Sigma Aldrich
Cloruro de sodio	NaCl	100	J.T. Baker
Dodecilsulfato sódico	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	99	Sigma Aldrich
EDTA	Na ₂ C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ .2H ₂ O	99	J.T. Baker
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	95	Sigma Aldrich

Etanol anhidro	CH ₃ CH ₂ OH	99.5	Sigma Aldrich
Fosfato de potasio dibásico monohidratado	K ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	99	Meyer
Fosfato de potasio dibásico	K ₂ HPO ₄ ⁻²	99	J.T. Baker
Fosfato de sodio monobásico	Na ₂ H ₂ PO ₄ ⁻	99	Merck
Glicerol	HOCH ₂ CH(OH) CH ₂ OH	99	Sigma Aldrich
Glicina	NH ₂ CH ₂ COOH	99	Sigma Aldrich
2-mercaptoetano	HSCH ₂ CH ₂ OH	99	Sigma Aldrich
Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	99	Sigma Aldrich
Nitrato de cobalto	Co(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O	98	Sigma Aldrich
Nitrato de sodio	NaNO ₃	99	J.T. Baker
Persulfato de amonio	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	99	Sigma Aldrich
Polietilenglicol 4000	H(OCH ₂ CH ₂) _n		Sigma Aldrich
Sulfato de Cobre dihidratado	CuSO ₄ ·2 H ₂ O	99	Sigma Aldrich
Sulfato ferroso	FeSO ₄ ·7 H ₂ O	98	Meyer
Sulfato de potasio	K ₂ SO ₄	99	Meyer
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	98	J.T. Baker
Sulfato de Zinc heptahidratado	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	99	Sigma Aldrich
Tetrametilen etilen diamina	C ₆ H ₁₆ N	98	Sigma Aldrich
Tris HCL	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ HCl	99	Sigma Aldrich

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. Microorganismo y condiciones de cultivo

La cepa de *Spirulina maxima* fue obsequiada por el Departamento de Biología del Lab. de Fisiología Vegetal de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional. Esta fue cultivada en matraces erlenmeyer con una capacidad de 800ml de cultivo, hasta obtener un inóculo de 6 L con una concentración de biomasa aproximadamente de 0.15 g/L. Después se utilizó un fotoreactor de 44 L de medio. Este cultivo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microalgas en el departamento de Bioingeniería y Biotecnología del CINVESTAV (Martinez, 2008). Con las siguientes condiciones 25 °C por 14 días con un flujo de aire 15 L/min e iluminación continua (80 ± μmol fotones /m²/s) con lámparas de fluorescentes de luz blanca, con el inóculo obtenido anteriormente. El material utilizado para el cultivo, así como el medio Zarrouk (Tabla 6) fue esterilizado a 121 °C y 15 lb de presión por 15 min (Olvera y col., 2003).

Tabla 6. Composición del medio de cultivo Zarrouk.

Reactivos	g/L	Reactivo	g/L	Solución de micronutrientes	
NaHCO ₃	16	MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.2	Reactivo	g/L
K ₂ HPO ₄ .H ₂ O	0.5	CaCl ₂ .2 H ₂ O	0.04	H ₃ BO ₃	2.86
NaNO ₃	2.5	FeSO ₄ .7 H ₂ O	0.01	MnCl ₂ .4 H ₂ O	1.81
K ₂ SO ₄	1.0	EDTA	0.08	ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0.222
NaCl	1.0	Sol. micronutrientes	1 mL	Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0.390
				CuSO ₄ .2 H ₂ O	0.079
				Co(NO ₃) ₂ .6 H ₂ O	0.0494

5.2.2. Determinación del crecimiento celular

El crecimiento de la *Spirulina maxima* se determinó por medio de la masa total de población en peso seco, cada tercer día se tomó una alícuota de 15 ml del cultivo por 15 días (Martínez, 2008).

5.3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FICOBILIPROTEÍNAS

Debido a que las ficobiliproteínas se producen intracelularmente, fue necesario realizar una operación de extracción con una solución acuosa y un tratamiento de ruptura mecánica de la pared celular, para su obtención. Por ello, después de filtrar la biomasa por cada gramo se agregó 4 mL de agua destilada y se ensayó cuatro métodos de extracción.

La concentración de ficobiliproteínas se calcula utilizando las ecuaciones 3, 4, y 5 basadas en los coeficientes de extinción específicos para pigmentos en cianobacterias, propuestas por Bennet and Bogorad en 1978 y Bryant en 1979 (Herrera y col., 1989).

$$C\text{-PC (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{A_{620} - 0.7 (A_{650})}{7.38} \quad (3)$$

$$\text{All-PC (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{A_{650} - 0.19(A_{620})}{5.38} \quad (4)$$

$$\text{PE (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{A_{540} - 2.8(\text{C-CP}) - 1.34 (\text{All-PC})}{12.7} \quad (5)$$

Donde A_{540} , A_{620} Y A_{650} representan las absorbancias ($\text{DO} = \log I_0/I$) medidas a 650, 620 y 540.

La eficiencia en la extracción de la C-ficocianina y su pureza, es medida como la

$$\text{Relación (r) C-Pc} = A_{620} / A_{280} \quad (6)$$

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Concentración de c-Pc} * 100}{\text{Concentración del extracto inicial de c-Pc}} \quad (7)$$

5.3.1. Ruptura celular

Se peso 1g de biomasa fresca húmeda en cada muestra, todas ellas se resuspendieron en agua destilada, se agitaron en un vortex durante 5 min.

- ❖ **Lisis celular**, la muestra se refrigeró a 4°C durante 15 h.
- ❖ **Sonicado**, la muestra se sónico a 4 °C por 5 min, 20 % amplitud.
- ❖ **Congelación-descongelación**, la muestra se sometió a ciclos de congelación a -20 °C y descongelación a temperatura ambiente 25 °C tres veces sucesivamente.
- ❖ **Congelación-descongelación/Sonicado**, se realizó tres ciclos de congelación-descongelación como anteriormente se mencionó y después se sónica por 5 min a 20 % de amplitud.
- ❖ **Congelación-descongelación/Agitación**, se realizó los tres ciclos de congelación-descongelación como anteriormente se mencionó y después se llevó a cabo una agitación constante a temperatura de 22 °C durante una hora. Con este último método se ensayo el siguiente paso.

Las muestras se centrifugaron a 15×10^3 rpm a 4°C por 30 min, la presencia de color azul es indicativo de extracto de ficobiliproteínas. Este se recolectó y se volvió a centrifugar a 18×10^3 rpm a 4°C por 30 min (en esta parte experimental se utilizó una centrifuga Beckman Coulter, Allegra). Se recolectó el sobrenadante coloreado de las extracciones y se leyó en un espectrofotómetro UV-Vis a las longitudes de onda 650, 620 y 540 nm, para obtener la concentración de ficobiliproteínas, utilizando las ecuaciones 3,4 y 5.

5.3.2. Soluciones de extracción

Las soluciones siguientes se utilizaron en la etapa experimental.

- ❖ **Regulador de Acetatos** 20 mM, pH 5.0 y 0.02 % de azida de sodio.
- ❖ **Regulador de fosfato** 20 mM, pH 7 y 0.02 % de azida de sodio.
- ❖ **Regulador de TRIS-HCl** 20 mM, pH 8 y 0.02 % de azida de sodio.

Además de agua destilada. Las muestras se centrifugaron a 15×10^3 rpm a 4°C por 30 min, la presencia de color azul es indicativo de extracto de ficobiliproteínas. Este se recolectó y se volvió a centrifugar a 18×10^3 rpm a 4°C por 30 min. Al término se recolectó el sobrenadante coloreado de las extracciones y se leyó en un espectrofotómetro UV-Vis a las longitudes de onda 650, 620 y 540 nm, para obtener la concentración de ficobiliproteínas, utilizando las ecuaciones 3,4 y 5. Por último se realizó un espectro de UV-Vis de 200 a 700 nm del extracto obtenido con el regulador de fosfatos 20 mM, pH 7.

5.4. PURIFICACIÓN DE C-FICOCIANINA

Una vez obtenido el mejor proceso de ruptura celular con los ciclos de congelación-descongelación más agitación en un regulador de fosfatos a 20 mM, pH 7, se procede a la purificación del extracto para obtener C-ficocianina pura.

5.4.1. Sistema de dos Fases acuosas de partición

El sistema de dos fases acuosas, formado por una mezcla de un polímero/sal ha sido utilizado para concentrar el extracto basándose en el diagrama de fases de la literatura (Ganapathi y Raghavarao, 2006; Rito y col., 2001).

A fin de lograr la formación del sistema de dos fases se mezclaron las cantidades necesarias de los siguientes reactivos PEG de un peso molecular nominal de 4000 y fosfato de potasio. En este sistema la composición (expresada en peso/peso) fue PEG 12.3 % y PO₄ 11.7 % (mono/dibásico en una relación 1:1.82) (Ganapathi y col., 2006).

- ❖ Se midió el volumen obtenido después de la ruptura celular antes de centrifugar, se peso las cantidades necesarias para la primera saturación con PEG y PO₄ (monobásico/dibásico) en el sistema anteriormente citado (basándose en la tabla 1 del apéndice).
- ❖ Se agitó durante 30 min manteniendo una temperatura de 20 °C para lograr la mezcla total de los compuestos y un pH 7.2. Una vez que se ha logrado la disolución total se centrifugo a 15×10^3 rpm a 4 °C por 30 min y el sobrenadante se recupero, después se volvió a centrifugar a 18×10^3 rpm 4 °C por 30 min.
- ❖ El sobrenadante de color azulado recuperado se le realizó una segunda saturación con el siguiente sistema (expresada en peso/peso) PEG 6.15 % y PO₄ 5.849 % (mono/dibásico en una relación 1:1.82) se peso las cantidades necesarias de cada reactivo correspondiente de PEG/ PO₄ (basándose en la tabla 2 del apéndice), se agito durante 30 min a 20 °C para lograr la mezcla total de los compuestos y un pH 7.2. Una vez que se ha logrado la disolución se colocó en tubos graduados. Se centrifugaron a 45×10^2 rpm a de 15°C por 15 min (Para esta parte experimental se utilizó una centrifuga Beckaman GS-GR-Centrifuge).
- ❖ Se anoto el volumen de la fase superior y la fase inferior, se separaron con una pipeta Pasteur y se recuperó la interfase. Esta última se disolvió en 3 mL con un regulador de fosfato 20 mM, pH 7, se determinó la concentración de C-PC con la ecuación 3, esta muestra se utilizó para la siguiente etapa. A cada fase recuperada se determinó el total de proteínas (con la técnica Brabford).

Para eliminar el resto de los contaminantes y el PEG de la interfase se utilizaron 3 procesos:

5.4.2. Diafiltración más Cromatografía de intercambio iónico

Se llevó a cabo una diafiltración con una membrana de diálisis de celulosa con una presión menor a 2.0 Kg/cm^2 de nitrógeno gas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 h. En seguida se depósito una muestra de 3 mL diafiltrada por una columna de cristal ($1.5 \times 30 \text{ cm}$) usando como intercambiador iónico Dietilaminoetil-celulosa (DEAE-Celulosa) preequilibrada con un regulador de TRIS-HCl a 50 mM y pH 7, después se eluyó manteniendo un gradiente lineal de 0-1 NaCl en TRIS-HCl a 50 mM y pH 7. Las Fracciones recolectadas de 1.5 mL, se determinó la purificación y la concentración de C-PC por espectrofotometría UV-Vis con la ecuación 3 y 6.

5.4.3. Diafiltración más cromatografía de gel de filtración

Se llevó a cabo una diafiltración con una membrana de diálisis de celulosa con una presión de 2.0 Kg/cm^2 a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 h. En seguida se depósito una muestra de 3 mL diafiltrada por una columna de cristal ($1.5 \times 30 \text{ cm}$) de Gel de filtración Sephadex-50 preequilibrada un regulador de fosfato 0.02 M, pH 7, se eluyó con el mismo regulador anteriormente utilizado. Se recolectaron fracciones de 1.0 mL y se determinó la purificación y la concentración de C-PC por espectrofotometría UV-Vis con la ecuación 3 y 6.

5.4.4. Ultrafiltración

Se realizó una ultrafiltración (UFC), (Amicon® ultra) con una membrana de Celulosa. El sistema se usó en conjunto con agitación magnética, con una presión 5.3 Kg/cm^2 de nitrógeno gas aplicando directamente a la UFC a 4°C . Al volumen retenido después de una hora se le agrega el regulador de fosfatos 20 mM, pH 7, hasta un volumen total de 3 mL y se repitió el mismo procedimiento anteriormente de UFC hasta obtener 1 mL de la muestra. Se determinó la purificación y la concentración de C-PC por espectrofotometría UV-Vis con la ecuación 3 y 6.

El porcentaje de recuperación de C-ficocianina de cada etapa se exprese relativa a la cantidad original del extracto de C-ficocianina adicionada a cada etapa del proceso, ecuación 7.

Con este último proceso se realizó la extracción y la purificación de 4 muestras de *Spirulina*.

- *Spirulina* cultivada seca
- *Spirulina* de Texcoco
- *Spirulina* AEH
- *Spirulina* ANDES

Se peso 0.1g de *Spirulina* seca y de 1 g de *Spirulina* recién cultivada, de cada muestra se le agrega 4 mL de regulador de fosfatos 20 mM, pH 7.

5.5. CARACTERIZACIÓN DE LA C-FICOCIANINA

5.5.1. Identificación de C-ficocianina por electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis es un método analítico–semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico, estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad. Es útil para determinar parámetros como peso molecular, punto isoelectrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas.

La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de Sodio en condiciones desnaturizante (SDS-PAGE) (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis por sus siglas en el idioma ingles) es un método rápido,

reproducibile y de bajo costo ampliamente utilizado para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas.

Se preparó un minigel de 0.75 mm, el cual consistió en un gel concentrador al 5 % y un gel separador de 20 % de acrilamida en Tris-CH/SDS Y pH 8.7. La separación se llevó a cabo en placa vertical y se aplicó una corriente de 90 mA de manera continua (Garcia, 2000).

Las muestras se diluyeron cuatro veces con el tampón de muestra, que en este caso se preparó con el tampón "stock" concentrado cinco veces. Se desnaturalizaron calentándolas a 100 °C durante 5 minutos en un baño de agua.

Para identificar C-PC se consideró su respectivo peso molecular. Además se empleo un C-PC comercial de de Sigma-Aldrich.

El diseño de las muestras cargadas en cada carril fue el siguiente:

- ❖ Carril A: Marcador del peso molecular (Cuenta con 10 proteínas con un peso molecular que va desde 4 a los 250 KDa, diseñados para geles Tris Glicina).
- ❖ Carril B: Se agregan 10 µL del extracto sin concentrar.
- ❖ Carril C: Se agregaron 10 µL de C-PC purificada de después de la ultrafiltración.
- ❖ Carril D: Se agregaron 10 µL de C-PC Sigma-Aldrich (Obtenida de *Spirulina sp.*).
- ❖ Después de la corrida electroforética se tiño el gel con azul de coomassie bajo sus condiciones estándar para su posterior desteñimiento el cual se identifican sus subunidades proteicas y análisis.

El cálculo del peso molecular fue usando los valores obtenidos por el estándar de peso molecular de las proteínas estándares. Por interpolación en la curva de calibración del Rf del pigmento-proteína se conoce el peso molecular.

5.5.2. Actividad de antioxidante en muestras de C-ficocianina por el método ABTS

Las sustancias antioxidantes son de naturaleza variada y pueden estar aisladas, a partir de extractos lipídicos y acuosos (Benedetti y col., 2004; Bhat y Madyastha, 2000).

- ❖ Se pesó 6.6×10^{-3} g de persulfato de potasio y 3.84×10^{-2} g del radical ABTS (ácido 2,2'-azino *bis* 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y se disolvió en 10 mL de agua destilada (solución madre).
- ❖ La solución anterior se protegió de la luz y se deja reposar entre 12 y 16 horas, posteriormente se coloca 0.5 mL de solución madre en un matraz volumétrico y se llevó hasta un volumen de 25 mL en un matraz aforado con etanol anhidro.
- ❖ Posteriormente se leyó la solución en el espectrofotómetro UV-Vis una longitud de onda de 734 nm y se ajustó hasta obtener como lectura una absorbancia de 0.7 ± 0.2 .
- ❖ Se pesó 1 mg de la muestra de C-ficocianina liofilizada y disuelve en 1 mL de agua destilada (solución 1). Después de esta solución se tomó 100 μ L y se llevó a un volumen final de 1000 μ L (Solución 2).
- ❖ Para tomar las lecturas de absorbancia de las muestras se colocó 990 μ L de reactivo estandarizado (0.7 ± 0.2) y 10 μ L de la solución 2 y se tomó la lectura de absorbancia en intervalos de 0 a 5 min. El blanco utilizado fue etanol anhidro.
- ❖ Seguir los mismos pasos para la C-ficocianina comercial Sigma-Aldrich.
- ❖ La referencia del reactivo consistió en una solución del radical ABTS^{•+} con el disolvente de la muestra. Los resultados se expresaron como valores TROLOX mediante la construcción de una curva patrón.

$$\Delta A_s = \frac{A_{tom} - A_{t5m}}{A_{tom} - \frac{(A_{tosol} - A_{t5sol})}{A_{tosol}}} \quad (8)$$

$$\%Inhibición = \Delta A_s * 100 \quad (9)$$

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1. Cultivo de *Spirulina maxima*

Se realizaron 3 ensayos previos a la obtención del cultivo *Spirulina maxima* para la separación de la C-PC, notando que si se cosechaba el cultivo después de 14 días se facilitaba la obtención de PBPS para obtener la mayor concentración. Por lo cual, se decidió obtener la biomasa húmeda de un cultivo 15 días y a partir de esta obtener el extracto de PBPS. En la Figura 9 se muestra el cultivo de la cianobacteria *Spirulina maxima* y la curva de crecimiento donde después del día 12 se mantiene constante.

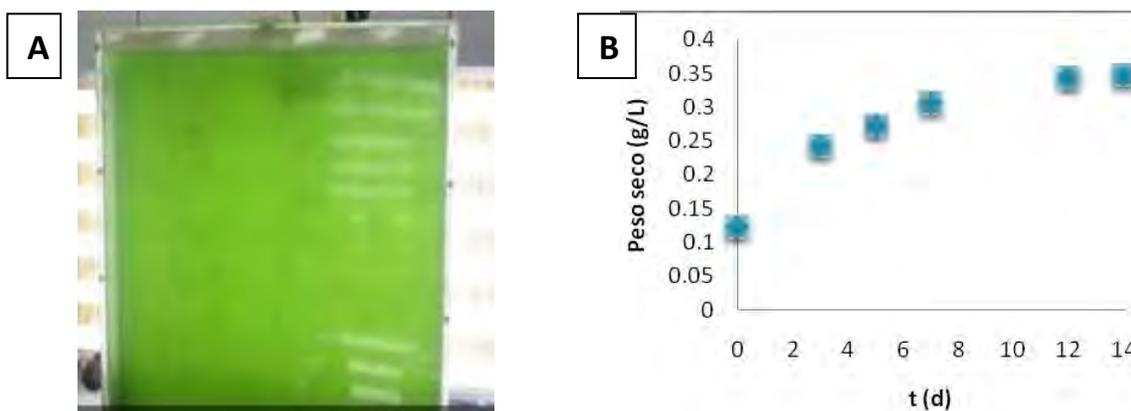


Figura 9. A).- Cultivo de *Spirulina maxima* en un Fotoreactor plano con flujo de aire continuo e iluminación con luz blanca. B).- Curva de crecimiento durante 14 días.

6.2. Estudio de ruptura celular

A fin de mejorar la ruptura celular e incrementar el porcentaje de liberación de C-PC intracelular, se realizó en esta investigación una comparación directa entre ruptura por 5 técnicas diferentes.

La eficiencia de los métodos se determinó en función de la concentración de C-ficocianina (mg mL^{-1}) obtenida de las ecuaciones 3, 4, 5 y de su pureza, expresada como la relación entre A_{620}/A_{280} .

De los cinco métodos ensayados, con el método de congelación/descongelación mas agitación a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se obtuvo la mayor concentración de C-ficocianina (2.03 mg mL^{-1}) y una

pureza (0.86). Con los otros métodos se obtienen cantidades significativamente menores de C-ficocianina y de menor pureza (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de diferentes técnicas de ruptura celular de la pureza y concentración de PBP de la cianobacteria de *Spirulina maxima*, utilizando agua destilada.

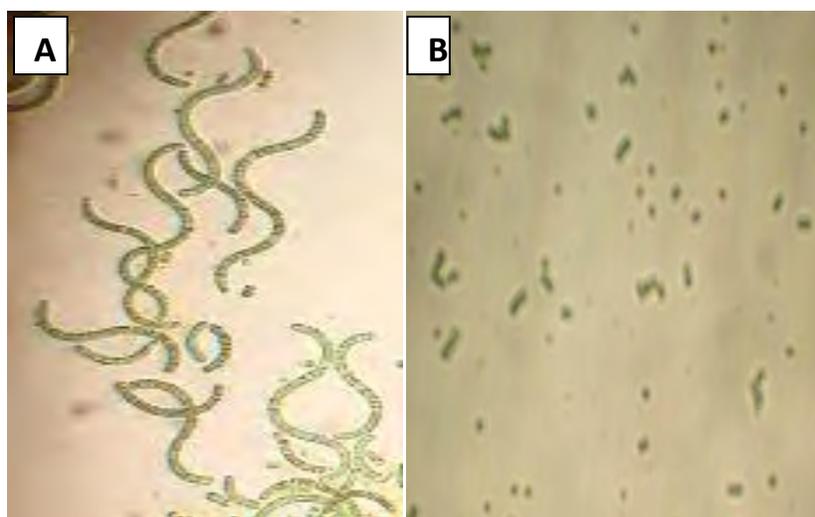
Ruptura Celular	r= C-PC	C-PC mg mL ⁻¹	APC mg mL ⁻¹	C-PE mg mL ⁻¹
Lisis Celular	0.82	0.05	3.039	-6.64E-06
Congelación/descongelación	0.91	1.54	0.642	-6.38E-08
Sonicado	0.79	1.36	0.909	-1.09E-05
Congelación/descongelación/ sonicado	0.78	1.87	1.612	7.35E-05
Congelación/descongelación/ agitación	0.86	2.03	0.136	-8.46E-10

Una vez elegido el método de congelación/descongelación mas agitación a 20 °C para la extracción de ficocianina de las células de *Spirulina maxima*, se ensayaron distintas soluciones de extracción con el fin de mejorar los rendimientos y la pureza.

De las soluciones de extracción utilizadas, la extracción con regulador de fosfatos a una concentración de 20 mM y un pH 7, es la que extrae la mayor concentración de pigmento 2.49 mg mL⁻¹ y la mayor pureza 0.88, por lo tanto, es la que se utilizó en todas las experimentaciones posteriores. Las restantes soluciones de extracción ensayadas resultaron todas de menor rendimiento y menor pureza que las obtenidas con agua destilada como disolvente (Tabla 8), aunque la extracción menos recomendada es la del regulador de acetatos ya que tiene la menor concentración 0.16 mg mL⁻¹ y la menor pureza 0.27. La ruptura celular seleccionada también se observó en el microscopio asegurándose que hubiese ruptura celular (Figura 10).

Tabla 8. Concentración y purificación extraídas de las células de *Spirulina maxima* por el método de congelación/descongelación mas agitación a 20 °C con diferentes soluciones de extracción.

Diferentes soluciones de extracción	r= C-PC	C-PC mg mL ⁻¹	APC mg mL ⁻¹	C-PE mg mL ⁻¹
Regulador de Acetatos, pH 5	0.27	0.16	0.062	6.74E-08
Regulador de fosfato, pH 7	0.88	2.49	0.309	-1.22E-09
Agua destilada	0.86	2.03	0.136	-8.46E-10
Regulador de Tris-HCl, pH 8.1	0.76	1.78	0.161	5.86E-07

**Figura 10.** A).- *Spirulina maxima* aislada, vista al microscopio antes de la ruptura celular. B).- Después de la ruptura celular por el método de congelación/descongelación mas agitación.

6.3. Purificación de C-ficocianina

Una vez seleccionado el mejor proceso de ruptura celular donde se desprende la mayor concentración y una mejor pureza de C-ficocianina dicho anteriormente se procede a purificar el extracto.

Diferentes estrategias de bioingeniería fueron adoptadas, a fin de optimizar un proceso determinado de recuperación y purificación. Para el caso de C-ficocianina, a fin de obtener un producto con un nivel de pureza elevado se considero un enfoque práctico el sistema de extracción por dos fases acuosas de partición.

En esta etapa se realizaron dos extracciones con PEG/fosfatos, en la última extracción se logró obtener una pureza de 2.8 (Tabla 8), donde se recuperó la interfase con mayor pureza de las dos fases superior e inferior (Figura 11).

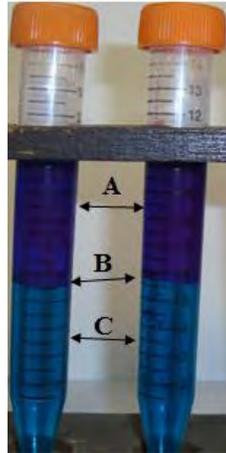


Figura 1. A).- Fase superior.
B).-Interfase. C).- Fase inferior.

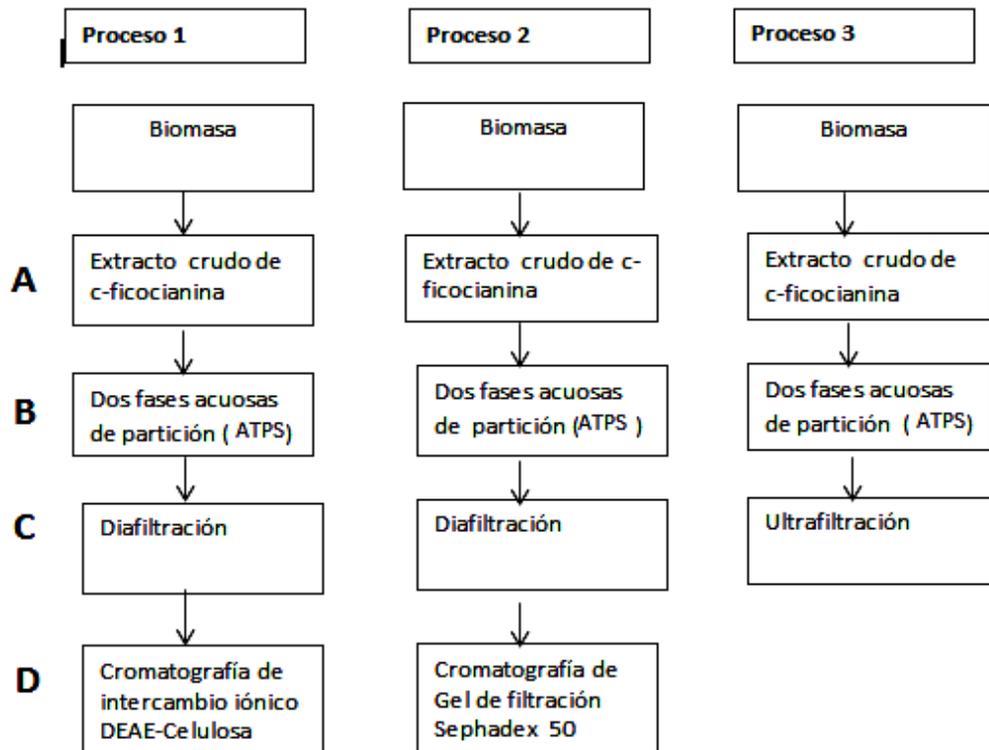


Figura 12. Diagrama de flujo de los 3 procesos de purificación de C-ficocianina.

Después de la extracción de dos fases acuosas fue necesario eliminar el PEG/Fosfatos y restos de contaminantes mediante tres procesos diferentes (1, 2, 3) (Figura 12). A fin de que C-ficocianina sea apta para su aplicación en alguna área en específico, en nuestro caso es emplearla para investigación en el área biológica.

En el primer proceso se realizó una diafiltración donde se obtuvo una pureza de 3.2, seguida de una cromatografía de intercambio iónico de DEAE-Celulosa con una pureza de 3.5. En el segundo proceso también se realizó una diafiltración después se paso por una columna de cromatografía de gel de filtración de Sephadex-50 donde la pureza mayor fue de 3.4. Finalmente en el tercer proceso, después de la extracción de dos fases acuosas se llevo a cabo una ultrafiltración para obtener una pureza de 3.9 (Tabla 9).

Analizando la Tabla 9 y 10 de los tres procesos diferentes el más adecuado es el proceso 3, ya que se obtiene una mayor pureza de 3.9 con un porcentaje de recuperación 57 % y una concentración 1.44 mg mL^{-1} . Con este proceso se reducirá las etapas de cromatografías, ya que estas tienen una menor pureza y un menor porcentaje de recuperación.

Tabla 9. Evaluación de purificación y recuperación en porcentaje en cada etapa y proceso de C-ficocianina. El proceso (1, 2, 3) y las etapas (A, B, C, D).

Purificación Proceso	A	B	C	D	Recuperación % Proceso	A	B	C	D
1	0.9	2.8	3.2	3.5	1	100.0	67.3	60.0	37.5
2	0.9	2.8	3.2	3.4	2	100.0	67.3	60.0	46.5
3	0.9	2.8	3.9		3	100.0	67.3	57.0	

Tabla 10. Evaluación de la cantidad en cada proceso (1, 2,3) y las etapas (A, B, C, D) de la purificación de C-ficocianina.

Proceso	A mg/mL	B mg/mL	C mg/mL	D mg/mL
1	2.53	1.71	1.54	0.95
2	2.53	1.71	1.54	1.18
3	2.53	1.71	1.44	

La etapa de la ultrafiltración dio un mejor desempeño para la purificación después del ATPS esta ha facilitado la separación de PEG y restos de contaminantes sin ningún tipo de daño a la integridad de C-ficocianina.

Este trabajo de investigación se presentó un proceso de recuperación y purificación que permite incrementar la pureza de C-ficocianina en 4.3 veces con respecto a la pureza del extracto crudo inicial, recuperando el 57 % de C-ficocianina con un valor comercial de \$ 5 dólares/mg (Rito y Col., 2011). Este proceso simplifica enormemente la manera mediante la cual C-ficocianina es extraída de *Spirulina maxima*.

Finalmente todas las muestras de C-PC fue liofilizado para obtener en forma de polvo para una mejor conservación (Figura 13).



Figura 13. C-Ficocianina liofilizada.

La selección de este proceso adecuado es una etapa de búsqueda en un espacio multidimensional que requiere una serie de experimentos para lograr la optimización eficiente. La condición óptima así obtenido es adecuado sólo para una biomolécula dada y no son válidas para otras la biomoléculas. Un enfoque bien diseñado sistemáticamente es necesario para reducir el gran número de experimentos. En vista de esto, los experimentos se planifico a través de un enfoque sistemático.

Después de obtener el proceso más adecuado y eficiente para la extracción y purificación de c-ficocianina, mencionado anteriormente se analizaron 4 muestra de *Spirulina* de diferentes marcas en polvo más la anteriormente experimentada.

Tabla 11. Evaluación de purificación de cada etapa del proceso 3 de las muestras de *Spirulina*.

MUESTRAS	A	B	C
<i>S. cultivada fresca</i> 1	0.88	2.77	3.84
<i>S. cultivada seca</i> 2	0.76	2.04	2.42
<i>S. Texcoco</i> 3	0.13	0.22	0.57
<i>S. AEH</i> 4	0.23	0.59	1.04
<i>S. ANDES</i> 5	0.42	0.96	1.45

Tabla 12. Evaluación de la concentración en cada una de las etapas del proceso 3 en las muestras de la *Spirulina*.

MUESTRAS	A (mg/mL)	B(mg/mL)	C(mg/mL)
<i>S. cultivada fresca</i> 1	2.55	1.71	1.54
<i>S. cultivada seca</i> 2	1.59	0.08	0.87
<i>S. Texcoco</i> 3	0.20	0.10	0.08
<i>S. AEH</i> 4	0.49	0.40	0.35
<i>S. ANDES</i> 5	0.77	0.62	0.57

Tabla 13. Evaluación de recuperación en porcentaje de cada una de las etapas del proceso 3 en las muestras de la *Spirulina*.

MUESTRAS	A	B	C
<i>S. cultivada fresca</i> 1	100	67.2	60.5
<i>S. cultivada seca</i> 2	100	61.2	54.5
<i>S. Texcoco</i> 3	100	47.8	39.7
<i>S. AEH</i> 4	100	82.0	71.3
<i>S. ANDES</i> 5	100	80.7	74.2

Como se puede observar en la Tabla 11, la pureza más alta desde la primera etapa hasta la última es de la *Spirulina* cultivada fresca obteniendo una purificación inicial de 0.88 y una

purificación final de 3.84 a diferencia de las demás *Spirulinas*, en segundo lugar se encuentra la *Spirulina* cultivada seca con una pureza final de 2.42, en tercer lugar se encuentra la *Spirulina* Andes con una pureza final de 1.45, en cuarto lugar se encuentra la *Spirulina* AEH con una pureza final de 1.02 y en último la *Spirulina* de Texcoco con una pureza final de 0.57.

Así mismo sucede con la concentración de C-ficocianina Tabla 12 donde se puede analizar que la mayor concentración de 1.54 mg mL^{-1} se obtiene de la *Spirulina* cultivada fresca, mientras tanto en segundo lugar se encuentra la *Spirulina* cultivada seca con una concentración de 0.87 mg mL^{-1} , en tercer lugar está la *Spirulina* de los ANDES obteniendo una concentración de 0.57 mg mL^{-1} , en cuarto tenemos a la *Spirulina* AEH con una concentración de 0.37 mg mL^{-1} y por último se encuentra la *Spirulina* de Texcoco con una concentración de 0.08 mg mL^{-1} .

El porcentaje de recuperación en cada *Spirulina* es de acuerdo a la concentración inicial del extracto y la concentración final de la C-PC. Donde se puede determinar que varía y el porcentaje más alto de recuperación es de 74.2 de la *Spirulina* ANDES sin embargo con una pureza menor de 1.45 (Tabla 13).

Tabla 14. Constante de partición de las cinco muestras de *Spirulina*.

MUESTRAS	K C-PC
<i>S.</i> cultivada fresca 1	1.04
<i>S.</i> cultivada seca 2	0.74
<i>S.</i> Texcoco 3	0.88
<i>S.</i> AEH 4	1.59
<i>S.</i> ANDES 5	1.50

En la Tabla 14 se puede apreciar los valores de la constante de partición obtenidos del experimento del sistema de dos fases acuosos de cada muestra diferente de *Spirulina*, el cual se determino con la fórmula 1. La concentración total de proteínas de cada fase se determino por el método Bradford.

Como se puede observar que la constante de partición mayor es de 1.59 de la *Spirulina* AEH, después le sigue la *Spirulina* de los Andes con una constante de partición de 1.50, mientras tanto la *Spirulina* cultivada fresca presenta una constante de partición de 1.04, la *Spirulina* de Texcoco tiene una constante de partición de 0.88 y por último la constante de partición menor es de 0.74 de la *Spirulina* cultivada seca.

Comparando las cuatro muestras de *Spirulinas* secas, se puede analizar entre menor sea la constante de partición mayor será la pureza. También es importante señalar las condiciones del cultivo, del secado, y el tiempo de almacenamiento. En el secado es común que utilicen deshidratadores con paneles solares que llegan a temperaturas mayores a 60 °C y cual lleva a desnaturalizarse las ficobiliproteínas, que también son sensibles a la luz.

La *Spirulina* cultivada seca, se realizó el secado a una temperatura entre 25-30 °C y esta fue la que obtuvo la pureza y concentración más alta, en comparación con las otras tres *Spirulinas* secas (*S. Texcoco*, *S. AEH* y *S. ANDES*).

Comparando las cinco muestras de spirulina, podemos observar que los mejores resultados nos los da la *Spirulina* cultivada fresca sin secar, con una mayor pureza y concentración.

6.4. Caracterización de C-ficocianina

6.4.1 Espectrofotometría UV-Vis

El extracto y purificado de C-ficocianina fue analizada por espectrofotometría en comparación con la muestra comercial (C-PC de Sigma). Los espectros de UV-Vis obtenidos de un intervalo de 200-700 nm se muestran en la figura 14, la absorbancia máxima de C-ficocianina son 619 nm para la muestra comercial y 620 nm el extracto y después de la ultrafiltración, respectivamente. La absorbancia obtenida de los espectros de cada una de las muestras se encuentra dentro del intervalo que se reporta en la literatura (Ganapathi y col., 2006; Glazer y col., 1973).

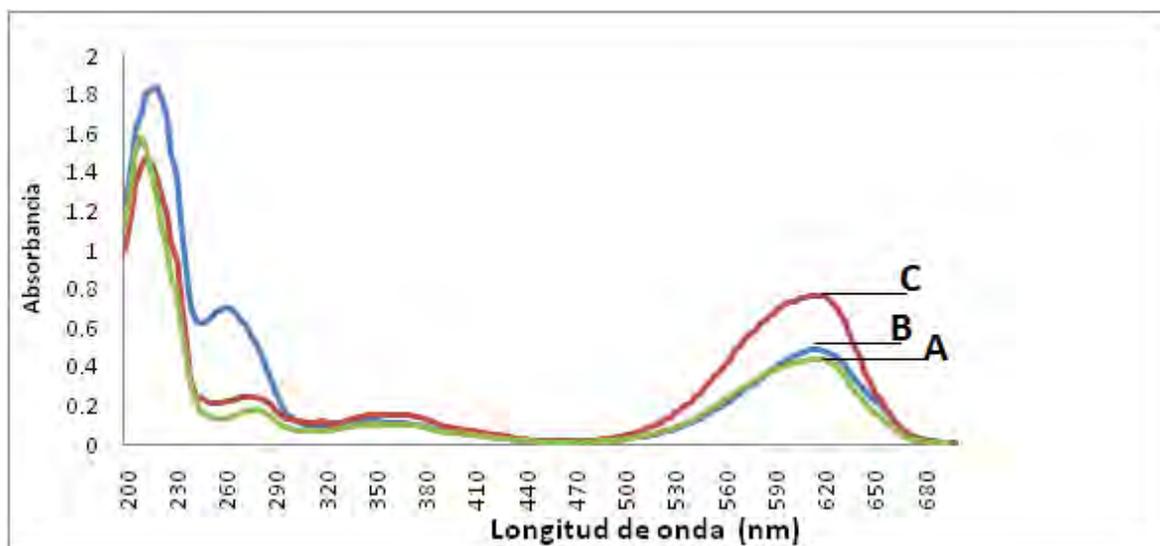


Figura 14. Espectros de UV-Vis de C-ficocianina de *Spirulina maxima*. A).- muestra de C-CP comercial sigma. B).- Extracto de C-PC. C).- después de la ultrafiltración.

6.4.2. Identificación de C-ficocianina por electroforesis en gel de poliacrilamida

El tratamiento adicional a la muestra proveniente del extracto crudo sugiere que el ATPS con PEG/fosfato seguido de una ultrafiltración permitió la remoción de las proteínas contaminantes en dicho extracto. En el Carril **A**, indica el marcadores moleculares, (expresado en kilodaltons (KDa)), en el carril **B**, se encuentra el extracto crudo de C-ficocianina provenientes de la ruptura celular, en el carril **C**, es la C-ficocianina purificada después del ATPS y en el carril **D**, se encuentra la C-ficocianina comercial.

Se observó la presencia de dos bandas (α y β) Figura 15, cuyos pesos moleculares se calcularon a partir de la interpolación de sus Rf en una recta de calibración teniendo en cuenta patrones proteicos de peso molecular conocido. Los valores obtenidos para cada banda fueron: ~ 19.5 y ~ 17.2 KDa, correspondientes a las subunidades α y β de la C-ficocianina, respectivamente (Figura 15) (Glazer y col., 1973).

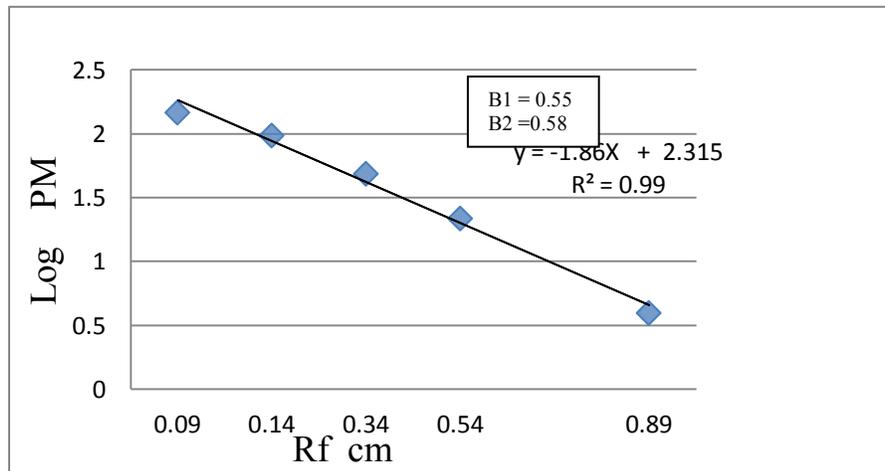


Figura 15. Gráfica de calibración de estándares de pesos moleculares, para la determinación del peso molecular de C-ficocianina de *Spirulina maxima* mediante en gel de SDS-PAGE.

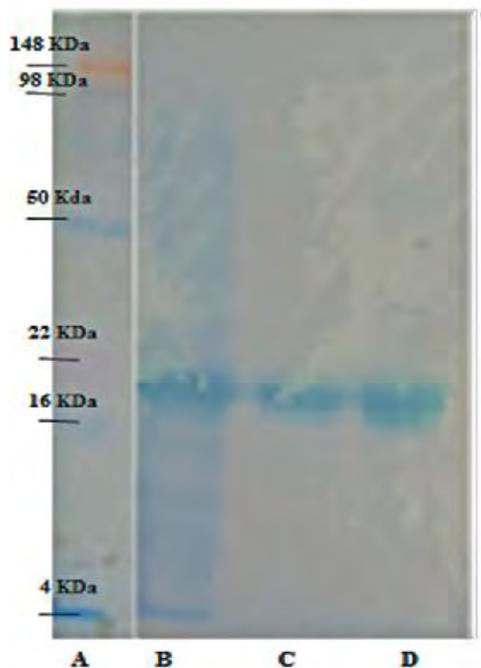


Figura 16. Gel de poliacrilamida obtenido por electroforesis del proceso 3, extracción y recuperación de C-PC. A).- Estándar de pesos moleculares. B).- El extracto crudo. C).- La C-PC purificada y D).- la C-PC sigma.

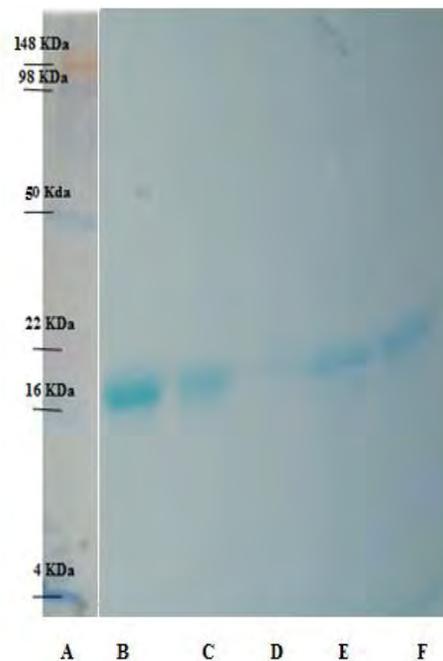


Figura 17. Gel de poliacrilamida obtenido por electroforesis de las diferentes muestras de *Spirulinas*. A).- Estándar de pesos moleculares. B).- *S.* cultivada fresca. C).- *S.* cultivada seca. D).- *S.* de Texcoco. E). *S.* AEH. F).- *S.* ANDES.

También se realizó la obtención del peso molecular de las diferentes spirulinas analizadas el cual se muestra en la Figura 17, donde se puede observar que en el carril **A**, se encuentra el marcador proteico de pesos moleculares (expresados en kilodaltons) en el carril **B**, pertenece a la *Spirulina* cultivada fresca, el carril **C**, la *Spirulina* cultivada seca, el carril **D**, a la *Spirulina* de Texcoco, el carril **e**, le corresponde la *Spirulina* de AHE y el carril **F** a la *Spirulina* procedente de los ANDES. El cual a partir del carril **B** hasta al **F** se observan las dos bandas que le corresponde a la C-ficocianina que es una característica de esta ficobiliproteína.

6.4.3. Actividad de antioxidante en muestras de C-ficocianina

La capacidad antioxidante de la C-ficocianina purificada fue comprobado por el ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS^{•+} se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+}, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS^{•+} es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. Los resultados se expresaron como valores de ΔA_s y % de inhibición obtenidos de la fórmula 8 y 9.

Tabla 15. Curva patrón de Trolox.

μg Trolox	A0	A5	ΔA_s	% Inhibición
0	0.707	0.699	0.012	1.247
0.63	0.710	0.612	0.141	14.086
1.26	0.712	0.570	0.203	20.283
1.89	0.717	0.481	0.335	33.471
2.52	0.706	0.397	0.446	44.589
3.15	0.710	0.286	0.608	60.796
3.78	0.705	0.251	0.655	65.536
0.61	0.700	0.622	0.118	11.775
0.77	0.689	0.593	0.147	14.746

Los valores por la técnica ABTS no son muy altos; sin embargo, se encuentra dentro de curva patrón usando como antioxidante Trolox, para las dos muestras de C-ficocianina, la purificada muestra un porcentaje de inhibición de 11.77 %, mientras que la muestra de C-ficocianina comercial presenta el 14.74 % de inhibición Tabla 15. La capacidad de antioxidante del reactivo ABTS^{•+}, se debe a una estructura completamente conjugada de dobles enlaces que reacciona fácilmente con reductores mediante un mecanismo SET y(o) HAT.

Al interpolar el % de inhibición de las dos muestras analizadas se obtiene, que la muestra de C-ficocianina purificada con un porcentaje de inhibición de 11.77 % con una concentración de 0.6114 μg de TROLOX mientras con un porcentaje mayor de inhibición de 14.74 % de la C-ficocianina comercial con una concentración de 0.7798 μg de Trolox respecto a la curva patrón usando como antioxidante TROLOX (Figura 18).

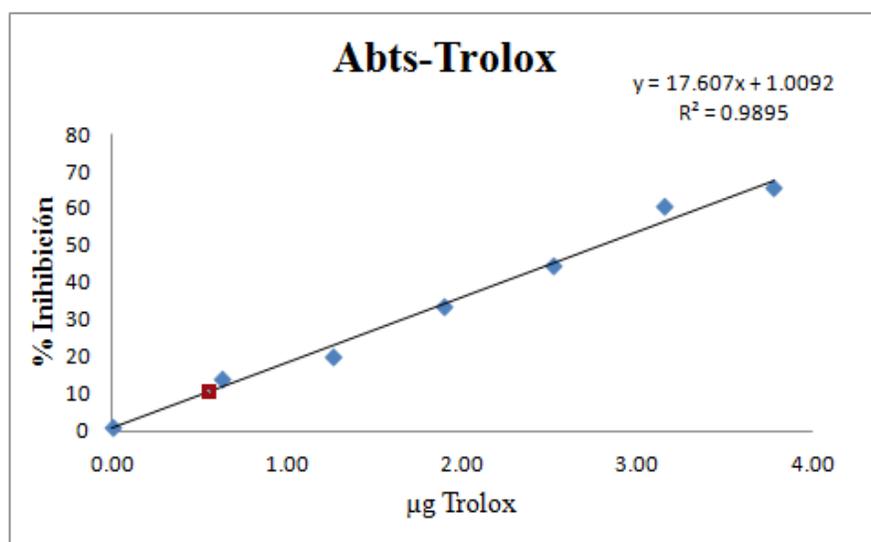


Figura 18. Curva patrón usando como antioxidante en μg de Trolox.

7. CONCLUSIÓN

- ❖ Las condiciones de cultivo, secado y almacenamientos de *Spirulina* influyen en la extracción y purificación de C-ficocianina.
- ❖ Se obtuvo C-ficocianina con un alto grado de pureza utilizando extracción en solución de un regulador de Fosfatos a un pH 7 por congelación y descongelación más agitación constante.
- ❖ El uso del sistema de dos fases permitió la recuperación de C-ficocianina con una pureza de 3.9 grado reactivo.
- ❖ La ultrafiltración es la mejor técnica para eliminar restos de PEG, sales y contaminantes.
- ❖ Los resultados obtenidos demuestran el potencial de aplicación del ATPS para recuperación y purificación de C-ficocianina en solo tres pasos, para el desarrollo de un proceso biotecnológico de purificación de un colorante proteico.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdulqader, G.; Barsanti, L.; Tredici, M.R. Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. *J. Appl. Phycol.* 2000. 12: 493-498.
- Badrish, S.; Ujival, T.; Datta, M. A novel method of single step hydrophobic interaction Chromatography for the purification of phycocyanin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property. *Bioresource Technology.* 2008. 99:188-194.
- Benedetti, S.; Benvenuti, F.; Pagliarani, S. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sci.* 2004. 75: 2353–2362.
- Betaacourt, F.L. Producción, purificación y caracterización de la ficocianina de *Synechococcus* sp. I09201 aislada en aguas de Cuba. Tesis Dr. Cien. Universidad de Coruña España. Fac. de Cien. 1997. 11-36.
- Bhat, V.B; Madyastha, K. M. C-phycocyanin: a potent peroxyl radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys.* 2000. 275(1):20–25.
- Borowitzka, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J Appl Phycol.* 1995. 7:3–15.
- Chamorro, G.; Salazar, M. Toxicología de la *Spirulina*. *Tecnología de alimentos.* 1995. 30: 13-14.
- Chamorro, G.; Salazar, M.; Favila, L.; Bourges, H. Farmacología y toxicología del alga *Spirulina*. Resumen. *Rev. Invest. Clin.* 1996. 48: 389-399.
- Ciferri, O. *Spirulina*, the edible micro-organism. *Microbiol Rev.* 1983. 47:551-578.
- Cifuentes, J.L.; Torres, G. P.; Frías, M. M. IX. *Algas*. http://omega.ilce.edu.mx/3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/087/htm/sec_27.htm. Consultado el: 3 de abril del 2009.
- Cisneros, R. M.; Rito P. M. Estrategias de Bioingeniería para la recuperación primaria de productos biológicos. *AMIDIQ.* 2005. 4:131-139.
- Cortés, B. M. Predicción del coeficiente de partición de proteínas en sistemas de dos fases acuosas a través de la caracterización bioinformática de su superficie. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile 2008.
- Costa, M.C.; Juliano, K.S. Strategy for a protein purification design using C-phycocyanin extract. *Bioresource Technology.* 2009. 100:5312–5317.

- Darley, W.M. *Alga Biology a Physiological Approach. Blackwell Scientifican Publication.* 1982.
- Frerix, A.; Geilenkirchen, P.; Muller, M.; Hubbuch, J. Separation of genomic DNA, RNA, and open circular plasmid DNA from supercoiled plasmid DNA by combining denaturation, selective renaturation and aqueous two-phase extraction. *Biotechnology and Bioengineering.* 2007. 96:57-66.
- Ganapathi, P.; Raghavarao, K.S.M. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. *Biochemical Engineering Journa.* 2006. 34:159-164.
- Ganapathi, P.; Chethana, S.; Sridevi, A.S.; Raghavarao, K.S.M. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *J. Chromatogr.* 2006. 1127:76–81.
- Gant, E. Phycobilisomes. *Ann. Rev. PlantPhysiol.* 1981. 32:327-347.
- García, P. H. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ. Dia.* 2000. 1(2):31-41.
- Glazer, A.; Fang, S.; Brown, D.; Spectroscopic properties of C-phycocyanin and of its α and β . *The journal of biological, chemistry.* 1973. 248:16.
- Glazer, A.N. Light Guides.-Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J Cell Biol.* 1989. 264(5):1–4.
- González, R.; González, A.; Ramírez, D. Protective effects of phycocyanin on galactosamine - induced hepatitis in rats. *Biotechnol Aplicada.* 2003. 20:107–110.
- Guglielmi, G.; Rippka, R.; Tandeau, N. Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina Sp.* And *Arthrospira sp.* Among Cyanobacteria, In: Doumenge, F.; Durand-Chastel, H.; Toulemont, A. Eds *Spiruline algue de vie.* Bullentin 'Institut Océanographique Monaco. Musée Océanographique. 1993. 12:13-23.
- HARRIS, E.L.V.; Angal, S. Protein purification methods a practical approach. 1^aEdición. IRL PRESS. U.S.A. 1989. 150-170.
- Herrera, A.; Boussiba, S.; Napoleone, V.; Hohlberg, A. Recovery of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima.* *J. Appl. Phycol.* 1989. 1:325-331.
- Hustedt, H.; Kroner, K. H.; Kula, M.R. In Partitioning in Aqueous two-phase systems: theory, methods uses and applications in biotechnology. eds. Academia Press, New York. 1985. 529-531.
- Johansson, G.; Albertsson, P. A.; Tjerneld, F. *Aqueous Two-Phase Separations, in Separation Processes in Biotechnology,* J.A. Asenjo, eds. CRC Press. 1990. 287-328.

- Kronick, M.N.; Grossman, P.D. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. *Clin. Chem.* 1983. 29(9):1582–1588.
- Laboratorios Almar *Productos: Spirulina*. Laboratorios Almar. www.geocites.com/labalmar/spirulina. Html. Consultado el: 30 julio de 2009.
- Liu, Y.; Xu, L.; Cheng, N. Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia k562 cells. *J. Appl. Phycol.* 2000. 12:125–130.
- Lone, J.; Lene, D.S.; Karsten, O. Heat and light stability of three natural blue colourants for use in confectionery and beverages. *Eur Food Res Technol.* 2005. 220:261–266.
- Martínez, R. A. Producción de biomasa de *Spirulina* en cultivo por lote utilizando un fotorreactor “air-lift” de cara plana y agua residual sintética. Tesis en maestría, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México. 2008. 5-10.
- Mesa, A.; Gaviria, C. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Rev. Cubana Plant. Med.* 2010, 15:13-26.
- Nam, K. H.; Chang, W. J.; Hong, H.; Lim, S.M.; Kim, D.I.; Koo, Y.M. Continuous-flow fractionation of animal cells in microfluidic device using aqueous two-phase extraction. *Biomed Microdevices.* 2005.7:189-195.
- Olvera, R.; Ríos, E.; García, V. *Manual de Técnicas para el Cultivo y Extracción de Bioproductos a Partir de Microalgas*. ENCB-IPN. México. 2003. 69.
- ORTEGA, M. M.; Godínez, J. L.; Garduño, S.G.; Oliva, M.G. *Ficología de México: algas continentales*. Eds. AGT. México. 1994. 221.
- Paniagua, M.; Dujardin J.; Sironval, C. *Crónica Azteca: El tecuitlatl, concentrado de algas espirulinas fuente de proteínas comestibles del pueblo de los Aztecas*. [www.spiralspring.com/h_Textos/Cronica%20 azteca](http://www.spiralspring.com/h_Textos/Cronica%20azteca). Consultado el: Abril de 2009.
- Ramírez, M.L.; Olvera, R.O. Uso tradicional y actual de *Spirulina Sp. (Arthrospira sp)*. *In Sc.* 2006. 31:9 657-662.
- Rôgner, M.; Nixon, P. J.; Diner, B. Purification and Characterization of Photosystem I and Photosystem II Core Complexes from Wild-type and Phycocyanin-deficient Strains of the Cyanobacterium *Synechocystis PCC 6803*. *The Journal of Biological Chemistry.* 1990. 265:11 6189-6196.
- Rito, P. M.; Nunez, L.; Amador, D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-Phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. *J. Chem. Tech. Biotech.* 2001. 76:1273–1280.

- Sánchez, M. Bernal, C. J.; Rozo, C.; Rodríguez I. *Spirulina (Arthrospira): an edible microorganism*. *Areview*.www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum/vol8n1/J_bernal.htm. Consultado el: 5 de agosto del 2010.
- Santos, M.C.; Noyalo, P.T.; Olvera, R. R. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix sp.* *Process Biochem.* 2004. 39(12):2047–2052
- Sekar, S.; Chandramohan, M. Phycobiliproteins as commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *J. Appl Phycol.* 2008. 20:113–136.
- Shibusawa, Y.; Takeuchi, N.; Tsutsumi, K.; Nakano, S.; Yanagida, A.; Shindo, H.; Ito, Y. One-step purification of histone deacetylase from *Escherichia coli* cell-lysate by countercurrent chromatography using aqueous two phase system. *Journal of Chromatography.* 2007. 1151:158-163.
- Soni B., Kalavadia B., Trivedi U., and Madamwar D. (2006). Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*-Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry.* 2004. 41:2017–2023.
- Yoshikawa, N.; Belay (Single-Laboratory Validation of a Method for the Determination of c-Phycocyanin and Allophycocyanin in *Spirulina (Arthrospira)* Supplements and Raw Materials by Spectrophotometry. *Journal of AOAC International.* 2008. 91:3 167-178.
- Vonshak, A.; Tomaselli, L. *Arthrospira (Spirulina): Systematics and Ecophysiology*. En *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda. 2008. 505-522.
- Walter, H.; Brooks, D. E.; Fisher, D. Purification of recombinant and human apolipoprotein A-1 using surfactant micelles in aqueous two-phase systems: recycling of thermoseparating polymer and surfactant with temperature-induced phase separation. Eds Academic Press, *Biotechnol Bioeng.* Orlando, FL. 1999. 371-811.
- Whitton, B. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In Mann N, carr N. *Photosynthetic prokaryotes*. Academic Plenum Press. Netherlands, U.S.A. 1992. 1-37.
- Whitton, B.A.; Potts M. Introduction to the cyanobacteria, 1-11. Kluwer Academic Publisher. Netherlands, U.S.A. 2000. 1-9.
- Yamanaka, G.; Glazer, A.N. Dynamic aspects of phycobilisome structure. *Arch. Microbiol.* 1980. 124:39-47.

9. APÉNDICE

Tabla1. La relación de cantidades de PEG/fosfatos (p/p) 12.3 % y 11.7 % (1:1.82).

Vo ml	PEG g	PO ₄ g	
		monobásico	Dibásico
1000	123.000	41.480	75.510
500	61.500	20.740	37.755
250	30.750	10.370	18.878
100	12.300	4.148	7.551
90	11.070	3.733	6.796
80	9.840	3.318	6.041
70	8.610	2.904	5.286
60	7.380	2.489	4.531
50	6.150	2.070	3.780
45	5.535	1.863	3.402
40	4.920	1.656	3.024
35	4.305	1.449	2.646
30	3.690	1.242	2.268
25	3.075	1.035	1.890
20	2.460	0.828	1.512
15	1.845	0.621	1.134
10	1.230	0.414	0.756
9	1.107	0.373	0.680
8	0.984	0.331	0.605
7	0.861	0.290	0.529
6	0.738	0.248	0.454
5	0.615	0.207	0.378
4	0.492	0.166	0.302
3	0.369	0.124	0.227
2	0.246	0.083	0.151
1	0.123	0.041	0.076

Tabla 2. La relación de cantidades de PEG/fosfatos (p/p) 6.15 % y 5.85 % (1:1.82).

Vo mL	PEG g	PO4 g	
		monobásico	Dibásico
1000	61.500	20.740	37.750
500	30.750	10.370	18.875
250	15.375	5.185	9.438
100	6.150	2.074	3.775
90	5.535	1.867	3.398
80	4.920	1.659	3.020
70	4.305	1.452	2.643
60	3.690	1.244	2.265
50	3.075	1.037	1.888
45	2.768	0.933	1.699
40	2.460	0.830	1.510
35	2.153	0.726	1.321
30	1.845	0.622	1.133
25	1.538	0.519	0.944
20	1.230	0.415	0.755
15	0.923	0.311	0.566
10	0.615	0.207	0.378
9	0.554	0.187	0.340
8	0.492	0.166	0.302
7	0.431	0.145	0.264
6	0.369	0.124	0.227
5	0.308	0.104	0.189
4	0.246	0.083	0.151
3	0.185	0.062	0.113
2	0.123	0.041	0.076
1	0.062	0.021	0.038