

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias Químicas

Efecto de la Luz Ultravioleta Sobre el Alga Spirulina Máxima

T E S I S

Que para obtener el título de :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Bioquímica Microbiológica

p r e s e n t a n :

MA. REMEDIOS CORDOBA CUEVAS

MA. DEL ROCIO GODINEZ QUEZADA

LETICIA ROSA SIMENTAL TOLEDO

México, D. F.

1980

M-21652



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Presidente, Prof. LILIA VIERNA GARCIA.
Vocal " ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN.
Secretario " ROSA MARIA RAMIREZ GAMA.,
1 er. Supl. " JORGE SOTO SORIA.
2o. Supl. " BEATRIZ LUNA MILLAN.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Microbiología experimental
Facultad de Química UNAM.

Hospital de Gineco! Obstetricia No. 2
Centro Médico Nacional.

Sustentantes:

CORDOBA CUEVAS MA. REMEDIOS
GODINEZ QUEZADA MA. DEL ROCIO
SIMENTAL TOLEDO LETICIA ROSA

Asesor del Tema:


Q. LILIA VIERNA GARCIA.

A G R A D E C E M O S :

En forma especial a nuestra asesora de Tesis Q. Lilia Vierna García, por sus conocimientos e información brindados, así como por la paciencia e interés que puso en el logro de este trabajo y nuestra superación académica.

También a todas aquellas personas que de una manera u otra han contribuido a la elaboración de este trabajo y nuestra formación profesional.

INDICE	Pág.
I OBJETIVO	1
II ANTECEDENTES	3
a) Históricos	3
b) Generalidades	7
- Características del alga (Cianofíceas)	7
- Características Físicas de la <u>S. maxima</u>	10
- Características Bioquímicas de la <u>S. maxima</u>	12
- Características Químicas y Biológicas de la <u>S. maxima</u>	20
III ECOLOGIA Y CULTIVO	24
IV CARACTERISTICAS DE LA RADIACION ULTRAVIOLE- TA Y VISIBLE	27
a) Efectos de la luz Ultravioleta	27
V EXPERIENCIAS REALIZADAS	48
a) Adaptación del medio	48
b) Importancia de la estructura y función de las Biliproteínas o Ficobilinas	50
- Procedimientos Analíticos	63
Material y Métodos	65
c) Importancia de los Carotenoides y Compues- tos relacionados	66
- Carotenoides Algales	68
- Procedimientos Analíticos	69

	Pág.
Material y Métodos	70
d) Importancia de la estructura y función de las Clorofilas	73
- Procedimientos Analíticos	76
Material y Métodos	76
e) Importancia y Características de las Proteínas	78
- Procedimientos Analíticos	80
Material y Métodos	80
f) Importancia y Generalidades de las Vitaminas	83
- Importancia de la determinación Microbiológica de las Vitaminas	84
- Características e Importancia de la Vitamina B ₂ (Riboflavina)	86
- Procedimientos Analíticos	89
Material y Métodos	89
- Importancia y Características de la Vitamina B ₁₂ (Cianocobalamina)	95
- Procedimientos Analíticos	99
Material y Métodos	99
- Características e Importancia del Acido Nicotínico	103
- Procedimientos Analíticos	105

	Pág.
Material y Métodos	105
g) Importancia de la determinación Química (Fluorimetría), de las Vitaminas	109
- Características e Importancia de la Vitamina B ₁ (Tiamina)	111
- Procedimientos Analíticos	113
Material y Métodos	113
h) Importancia y Evaluación de la Irradiación	119
- Fundamento de la determinación de la Irradiación	120
- Diseño y Evaluación del Experimento	121
VI RESULTADOS	125
VII DISCUSION	129
VIII CONCLUSIONES	132
IX APENDICE	134
X BIBLIOGRAFIA	136

lorantes destinados a productos alimenticios, tomando en cuenta que los últimos estudios sobre la toxicidad de los colorantes artificiales de origen mineral han confirmado el alto grado de ésta.

Para este propósito se utilizó la energía de una fuente luminosa, en el Valle de México por medio de la fotosíntesis del alga Spirulina maxima.

II ANTECEDENTES

a) Históricos:

En México, en las descripciones hechas por los conquistadores se pone en evidencia que los habitantes de Tenochtitlan (actualmente Ciudad de México), comían considerables cantidades de algas azul-verdes (Cyanophyta), de especies desconocidas. (23), (26)

Es interesante encontrar en "La Conquista de México" de Prescott, informes de una "lama" recogida del lago y comida por los nativos, "no contentos con su alimentación diaria, ellos comían una cierta substancia lodosa que flotaba en el agua del lago, la cual secaban al sol y presionaban para hacerla como un queso, al cual se asemeja en sabor y gusto, al que daban el nombre de "Tecuitlatl" o "Excremento de Piedras".

Los antiguos pobladores del Valle de México fueron un pueblo eminentemente guerrero, y tuvieron que soportar continuas luchas, invasiones y destierros hasta encontrar finalmente un territorio donde asentarse.

Cuentan los historiadores que cuando los aztecas, una tribu muy poco apreciada por sus vecinos, precisamente por su espíritu guerrero, pidieron al rey Cocochtli un lugar donde establecerse, éste con la aviesa intención de destruirlos los en-

vió a Tizaapan (Tizapán), sitio donde abundan las viboras venenosas. Los aztecas sin embargo, dieron la sorpresa: en lugar de que las serpientes los aniquilaran, ellos acabaron con dichos réptiles, comiéndoselos asados o cocidos.

Al fin de su largo peregrinar, los aztecas se asentaron en el punto donde vieron los símbolos que les había señalado su dios Huitzilopochtli: un águila sobre un nopal y en medio un gran lago. El lugar, evidentemente fue el lago de téxcoco, en donde permanecieron durante algún tiempo, cercados por otras tribus que los atacaban cuando salían de ese territorio. Por tal motivo, los aztecas debieron restringir en grado máximo sus actividades agrícolas y vivir de los productos de la región y del lago; tales como los patos, las ranas, el gusanillo de la laguna y el Tecuitlatl, que era como ellos llamaban a la Spirulina, la que comían en forma de torta después de haberla puesto a secar al sol. (27)

Cita también Bernal Díaz del Castillo en su obra "Historia de la Conquista de México", lo siguiente: "pues pescadores y otros que vendían unos panecillos que hacen de una como lama que cogen de aquella gran laguna, que se cuaja y se hacen panes de ello, que tienen un sabor a manera de queso".

Cortés durante su retiro en España provee información a Gómara, quien escribió ... "y aún tierra; porque con redes de malla muy menuda, aburren en cierto tiempo del año una cosa mo

lida que se cría sobre el agua de las lagunas de Méjico, y se cuaja, que ni es yerba, ni tierra, sino como cieno. Hay dello mucho y cogen mucho; y en eras como quien hace sal lo vacian, y ahí se cuaja, y seca, hacenlo torta como ladrillo, y no solo lo venden en el mercado, más llevanlos también a otros fuera de la Ciudad y lejos. Comen esto como nosotros el queso, y así tienen un saborcillo de sal, que con el chil molli es sabroso. Y dicen que a este cebo vienen tantas aves a la laguna, que muchas veces por invierno la cubren por algunas partes".

El franciscano Fray Toribio de Benavente conocido como -- "Motolinia", hace referencia más detallada sobre la preparación de Tecuitlatl en su libro "Historia General"... "Críanse sobre el agua de la laguna de México unos como limos muy molidos, y á cierto tiempo del año, que están muy cuajados, cogenlos indios con unos rejoncillos de malla muy menuda, hasta que inchen los acales o barcos de ellos, y á la ribera hacen sobre la tierra o sobre arena, unas eras muy llanas, con su borde de dos o tres brazos en largo y poco menos de ancho, y échanlos allí á secar; echan hasta que se hace una torta de gordor de dos dedos y en pocos días se secan hasta quedar gordor de un ducado escaso; y cortada aquella torta, como ladrillos anchos, cómenlos mucho los indios y tiénese buenos; anda esta mercadería por todos los mercados de la tierra, como entre nosotros los que son de la salsa de los indios es bien sabroso, tiene -

un saborcillo de sal".

Bernardino de Sahagún fraile franciscano conoció muy bien a los nativos y en su "Historia Universal" los describe brevemente con respecto a sus costumbres religiosas y sociales, lo que cuenta de Tecuitlatl es corto, pero interesante... "hay -- unas urrosas § que se crían sobre el agua que se llaman Tecuitlatle: son de color azul-claro; después hacen unas tortas de ello, y tostadas las comen".

La frase clave entre éstas referencias es la de Sahagún - quien cita el color azul-claro de Tecuitlatl.

Estas plantas primitivas deben su color a la presencia de la ficocianina, pigmento azul (proteína tetrapirrólica), la -- cual es algunas veces acompañada de la ficoeritrina, pigmento rojizo. Sobre algunas láminas de agua en los Estados Unidos y Canadá se desarrollan en abundancia en ciertas estaciones y se conocen como "florecimiento de agua". Florecen en aguas dulces y salobres, y algunas especies utilizan el nitrógeno atmosférico. Aunque ésto pudiera no ser necesario en el lago de Texcoco donde presumiblemente recibe el nitrógeno de las aguas de los albañales procedentes de la Ciudad. (26)

Sin embargo, el consumo de algas no ha sido privativo de nuestros antiguos mexicanos. Los Canebus del Tchad, una tribú africana compuesta por hombres muy robustos, son hasta la fecha buenos consumidores de algas y también conocen la Spiruli-

na, la cual preparan en forma similar a la de los aztecas: dejando secar la torta al sol y condimentandola con tomate, cebolla y ajo. Los lugareños dan a este platillo el nombre de Dihe (27)

Los cronistas no aclaran si Tecuitlatl desarrolla en las porciones de agua dulce o salada del lago.

Humboldt dió una gráfica para la densidad del lago, la cual corresponde aproximadamente al 2.3-3.0 % de sales disueltas, en donde predominan, cloruro de sodio y carbonatos; no se encuentran sulfatos. (26)

b) Generalidades:

- Características de las algas "Cianofíceas"

Las Cianobacterias (antes llamadas algas azul-verdes), son organismos procarióticos-fototróficos que emplean el agua como donador de electrones y así producen oxígeno en la luz.

Las células de estos organismos están cubiertas por una pared celular multiestratificada formada por una capa interna de péptidoglucano. La pared puede estar a su vez rodeada por una envoltura gelatinosa o fibrosa.

La mayor parte de las Cianobacterias son móviles en algunas fases de su desarrollo, la movilidad es siempre del tipo -

deslizante, dependiendo de la superficie de contacto. La región citoplásmica es atravesada por un extenso sistema de acoplamiento fotosintético laminado, llamado tilacoides y en la superficie externa contienen gránulos característicos denominados ficobilisomas, formados por agregados de los pigmentos ficobiliproteínicos.

Las Cianobacterias pueden ser unicelulares o pueden componerse de células filamentosas simples o ramificadas:

La reproducción de las formas unicelulares puede efectuarse por fisión binaria múltiple o por desprendimiento seriado de células apicales (exosporas), de una célula individual sessil.

Las formas filamentosas se desarrollan por repetida intercalación de células que se dividen y se reproducen por fragmentación al azar del filamento o por desprendimiento terminal de las cadenas de células móviles cortas, llamadas hormogonios.

Existen ciertas formas de filamentos que pueden producir células especializadas conocidas como acinetos y heteroquistes. Los primeros son mayores que las células vegetativas en el filamento y representan una fase estacionaria, los que germinan con la liberación del hormogonio. Los heteroquistes no son células reproductoras, y se distinguen de las células vegetativas por la presencia de gránulos polares refringentes y de una pared externa; se cree que son células fisiológicamente espe-

cializadas que sirven como sitios fijadores de nitrógeno.

Los fotopigmentos característicos de las Cianobacterias - incluyen: Clorofila a, como el único pigmento clorofiliano y - Ficobiliproteínas (Aloficocianina, Ficocianina y algunas veces Ficoeritrina). (11)

El espectro de absorción celular tiene un pico aproximado de 680 nm, atribuible a Clorofila a, y a una extensa banda de absorción con uno o más picos, atribuibles a Ficobiliproteínas entre los 560 y 630 nm. (42)

Las Cianobacterias difieren de las bacterias en que generalmente son fotoautótrofas obligadas y obtienen su carbono y energía mediante mecanismos fotosintéticos similares a los de los vegetales superiores.

Taxonomía o Clasificación del alga

División	Cyanophyta
Clase	Cyanophyceae
Orden	Nostocales
Familia	Oscillatoriaceae
Género	Spirulina
Especie	maxima

Nota.- Se empleó la clasificación clásica. (9)

- Características Físicas de la Spirulina maxima

a) Una de las características de la Spirulina como microorganismo, es su gran tamaño. El alga Spirulina tiene la forma de tricoma, que muestra su estructura espiral típica. Su longitud es de 300 - 500 micras, es decir, mide 0.3 - 0.5 mm y es visible a simple vista; así que para cosecharla, no es necesario usar centrifugación, como en el caso de la Chlorella, sino simplemente se filtra con malla. Es una de las ventajas en la producción masiva.

b) Cuando la Spirulina alcanza cierto tamaño, se dividen sus células en aproximadamente diez fragmentos y el tiempo necesario para que se lleve a cabo la fragmentación o multiplicación de una célula en diez fragmentos, es de un día, en comparación con la Chlorella, que generalmente una célula madre se fragmenta en cuatro partes, así que el estado de reproducción se puede mostrar con la siguiente fórmula:

$$V = a \times 10^n$$

Donde V es el grado de velocidad de la reproducción; a es el número de fragmentos iniciales o el peso expresado en gramos y n representa los días de cultivo.

Entre las pequeñas algas, la Spirulina pertenece a la clase de alta tasa de reproducción, lo cual es ventajoso desde el punto de vista de la producción industrial.

- c) Muchas de las algas están cubiertas por una vaina mucilaginosas, a la que se le adhieren muchos microbios, por eso cuando se realiza un cultivo se produce contaminación. Sin embargo, - la Spirulina no tiene esta vaina, lo que permite cosecharla en un estado relativamente puro.
- d) La Spirulina es resistente a las temperaturas elevadas y -- por otro lado resiste también temperaturas bajas, hasta de --- 10⁰C bajo cero.
- e) Presenta una gran resistencia a la luz U.V.: si se cultiva bajo rayos U.V., se previene la contaminación por otros microorganismos.
- f) Posee resistencia frente a los álcalis fuertes, para su reproducción necesita de aguas fuertemente alcalinas.
- g) Resiste altas concentraciones de sal y se han reportado en su habitat original contenidos de 10 - 20 % de sal. En tal circunstancia generalmente no sobreviven otros organismos, previniendo esto la contaminación por bacterias.
- h) La Spirulina tiene una gran capacidad de flotación. Esto facilita la cosecha porque se recolecta en forma masiva. Así se evita el proceso de concentración por otros medios. Cuando se reprodujo en el tanque de cultivo se observó una relación entre la flotación y la salinidad, lo que ayudaba a la flotación de la Spirulina, incrementándose ésta con la adición de una solución al 0.008 % de EDTA.

i) La Spirulina tiene un alto valor alimenticio, ya que contiene una gran cantidad de proteína. La soya seca contiene 39 %.- la Chlorella de 40 - 50 % y la Spirulina de 67 - 70 %, con un máximo de 80 % de proteínas.

La Spirulina contiene Clorofila y lleva a cabo activamente la fotosíntesis produciendo diferentes elementos orgánicos, donde los elementos de asimilación son compuestos del tipo de almidones animales y no del de almidones vegetales.

Dentro de las células de la Spirulina no se observa núcleo, pero contiene una gran cantidad de RNA. La cantidad de RNA de los productos secos llega hasta 4.25 %, éste RNA ha llamado la atención como medicamento. Al respecto, la Spirulina es digna de mayor atención como material natural y alimento nutricional.

Además, las plantas primitivas como la Spirulina contienen elementos desconocidos que poseen efectos medicinales, y que tal vez puedan utilizarse en el futuro. (30), (49)

- Características Bioquímicas de la Spirulina maxima

Los análisis que se han efectuado sobre las algas del lago Tchad y del lago de Texcoco, han aportado información acerca de su contenido de ácidos nucleicos (RNA Y DNA), proteínas, pigmentos y ciertos constituyentes de la fracción lipídica.

ca (esteroles y triterpenos).

Desde el punto de vista de los estudios citológicos se ha acordado considerar a la Spirulina dentro de la familia de las Oscillatoriaceae y del orden Nostacales. Tanto la fuente de -- origen Tchaideano (S. platensis), como la de origen Mexicano - (S. maxima o geitleri), o de otras partes pueden ser induci-- das a formas anormales más o menos desarrolladas que se encuen-- tran contaminadas por las Oscillatorias simbióticas.

Mucho se ha investigado, sobre si los ácidos nucleicos de las dos fuentes (Tchaideana y Mexicana), se comportan en la -- misma forma o en forma diferente frente a las reacciones bio-- químicas.

Entrando en detalles sobre las técnicas se indica simple-- mente que la cuantificación del RNA y DNA se efectuó tras la - extracción por ácido perclórico, las pruebas fueron hechas en-- medio de orsinol, según Ceriotti, para el RNA y pruebas de in-- dol según el método de Schmidt y Thanhauser, para el DNA, los-- resultados obtenidos fueron los siguientes:

	Total de ácidos nucleicos.
<u>S. platensis</u>	4.25 %
<u>S. maxima</u>	4.29 %

La S. platensis africana se encuentra con exactitud en ve-- rano, liofilizandose el cultivo de acuerdo a las bases del --- I.F.P. en Rueil Malmaison (Francia); la S. maxima se cultiva -

anualmente en el "caracol" evaporador solar, secándose después en un atomizador de acuerdo al método de la Sociedad SÓSA TEX-COCO S.A. (México).

Los resultados obtenidos nos muestran que estas Cianofi--ceas, contienen aproximadamente de 4 a 5 g de ácidos nucleicos totales por 100 g de alga seca. El interés de ésta observación para los nutricionistas reside en el hecho de que las Spirulinas no se sobresaturan en su régimen de nitrógeno puro ó pirimidico.

Por otra parte para precisar la posición taxonómica de -- estas dos especies de Spirulina, se efectúa una separación cro--matográfica por medio de columnas de "Sephadex G 10".

Los cálculos para RNA, después de la extracción se dan en base a porcentajes y se reporta: Purina - Pirimidina, los cálculos para DNA se reportan: AT/GC y los cálculos se dan en i--gual forma. Como se muestra en la tabla A del apéndice.

Lo reportado sobre AT/GC, difiere significativamente en -- las dos especies, aquí se da una parte del fundamento en el -- aprovechamiento bioquímico de la taxonomía de la Spirulina y -- muestra que los genomas diferentes son un producto de las ba--ses asimétricas; así que los genotipos son muy cercanos.

En el RNA son dominantes (G - A) y en el DNA predomina -- (G - C), esto parece que es muy frecuente en las algas.

El contenido de nitrógeno total fué medido por el método-

de Kjeldahl durante el verano, sobre diversas muestras de origen Mexicano y de origen Tchaideano, señalando una variabilidad relativamente importante en los resultados y que son una consecuencia de la heterogeneidad de las condiciones del cultivo. No obstante, según el origen del alga, los resultados están comprendidos entre 8.5 y 12 %; aquí se aplica el coeficiente multiplicandolo por 6.25, dando un porcentaje de materia nitrogenada total para reporte de materia seca, con variantes entre 53 y 75 %. No se conoce lo suficiente sobre medidas directas de RNA para establecer una correlación entre la riqueza en RNA y el porcentaje de materia nitrogenada total.

El alga seca es un alimento particularmente rico en materia nitrogenada, esencialmente en proteínas.

Presencia de Triterpenos y Esteroles

En lo concerniente a la expresión fenotípica del genoma - bajo la forma de biosíntesis de moléculas específicas, se ha investigado sobre las dos fuentes: esteroides y alcoholes triterpénicos. Se efectuaron análisis por diferentes métodos para estas dos clases de moléculas, más los resultados obtenidos -- fueron contradictorios; pero respecto a la biosíntesis de ---- otras moléculas como los carotenos, los resultados fueron buenos e indican que son muy abundantes en las dos especies de -- Spirulina. Por cromatografía de gases (gas - líquido), complementada con espectrometría de masas, se identificó todo lo re-

lacionado con el colesterol y el fucoesterol en la Spirulina platensis, así como la alfa y beta amarina.

En la Spirulina maxima, existe evidencia de la presencia del colesterol como esteroles principal, además de los esteroides arriba anotados en menor escala. La Spirulina platensis tiene como diferencia el stjmostanol, también se encuentran presentes ciertos alcoholes triterpénicos, además de la diferencia en la estructura y concentración que se ha encontrado en la de origen Tchaideano. Las conclusiones análogas son obtenidas por el I.F.P. y sobre la nomenclatura de la "fuente del Océano Pacífico". Aquí existe una diferencia metabólica común, pero con variaciones moleculares.

Dentro de los cultivos de laboratorio, es posible recolectar todos los días las secreciones orgánicas blancas producidas por la Spirulina. En las muestras orgánicas complejas (péptidos, glucopéptidos...), se ha visto bajo las mismas técnicas de extracción e identificación, que el colesterol es el esteroles más abundante, después el beta citoesterol, luego en cantidades reales viene el fucoesterol y el compesterol.

De acuerdo con los medios utilizados por el I.F.P. y suplementados con acetato de sodio en concentraciones que varían desde 5 mg/lit hasta 5 g/lit. En la concentración dominante se obtuvo Spirulina de aspecto normal; utilizando acetato de sodio con C^{14} radioactivo se encontró la incorporación de esta -

molécula a la porción lipídica y a la vez en los ácidos grasos y sobre el total de grasas insaponificables. Predominan en los carotenos y los escualenos, después en los alcoholes triterpénicos y por último en los esteroides. Las concentraciones superiores a 5 g/lit son tóxicas para la Spirulina produciendo desviación a nivel de brotes en estado juvenil.

Pigmentos responsables del color de la Spirulina

Las principales sustancias responsables del color de la Spirulina son las siguientes:

- Clorofila a
- Ficobilinas (Ficocianina y Ficoeritrina)
- Carotenoides: Son una disociación de moléculas cuyo principal componente es el beta caroteno, aproximadamente el 80 %, - después la ficoxantina, la beta criptoxantina, la zeaxantina y la equinona.

Estas sustancias confieren a la Spirulina un color azul-verde muy pronunciado, susceptible de aceptarse, por lo menos - en ciertos países debido a ciertas costumbres alimenticias y algunos problemas de aceptabilidad.

En relación con el I.F.P. se llevó a cabo un trabajo sobre decoloración de la Spirulina, para el cual se fijó especialmente como objetivo lo siguiente:

- Obtener un polvo proteico poco colorido pero que mantuviera la totalidad de las proteínas.

- Respetar lo más posible la calidad nutricional de la Spirulina y particularmente la disponibilidad de los aminoácidos -- indispensables.
- Determinar un protocolo industrial de decoloración de la -- Spirulina.

Según Kumagawa, con la ayuda de un extractor, se tuvo total acceso sobre las pequeñas cantidades de Spirulina, obteniéndose los resultados siguientes: es preferible de utilizar como materia seca a la Spirulina, de preferencia no practicar la extracción en medio acuoso donde las ficocianinas son eficientemente extraídas por el agua salada; a causa de las modificaciones sufridas en las proteínas de las Spirulinas en el momento del tratamiento en fase acuosa.

Los diversos solventes orgánicos autorizados por la P.A.G., se comparan en lo concerniente a sus acciones decolorantes solos o en mezclas: acetona, dicloroetano, etanol, heptano, -- hexano e isopropanol.

Los solventes más eficientes según estos estudios son: la acetona, el isopropanol, el etanol y el dicloroetano.

Con la ayuda de un extractor de 2 litros y con el precedente de los cuatro solventes comparados y los ciclos operativos determinados en verano fué posible seleccionar esta mezcla 80 % de etanol, 20 % de acetona; como prácticamente la más eficiente.

Aproximadamente con 20 Kg de polvo protéico de Spirulina-decolorada se obtiene un rendimiento de 80 % de alga seca que contiene practicamente el total del nitrógeno inicialmente presente.

El contenido residual de este polvo es muy efectivo en ficocianina y en clorofila, más el resto tiene una cantidad apreciable de carotenos iniciales.

En los primeros análisis efectuados por el Sr. Vermorel - del INRA de Theix, indican que la decoloración no influye en la digestibilidad de la Spirulina, más el producto es consumido un poco menos que la Spirulina en bruto. En lo que respecta al color y al gusto, el polvo decolorado no es de olor fuerte, pero guarda un gusto menos acusado que las algas iniciales.

En el momento que éstos son incorporados en un alimento se hace una concentración aproximada del 10 %.

El tratamiento de decoloración de Spirulina nos lleva a un polvo particularmente rico en nitrógeno protéico y total (13 %), que tal vez se incorpore fácilmente en numerosos alimentos, en particular los destinados a los niños.

Los países productores de Spirulina podrán tener acceso a un alimento de alto valor protéico como producto secundario después de la extracción e industrialización de los pigmentos. (9), (13), (20), (22), (28), (46), (47) y (51)

- Características Químicas de la Spirulina maxima.

La estructura e infraestructura de las Cianofíceas observada en microscópio electrónico han sido dadas como referencia especial a su aparato fotosintético.

Las partículas membranoides que la constituyen son los diferentes halocromos clorofílicos y otros pigmentos (ficobilinas, carotenoides y pigmentos de la cadena de transferencia de electrones), las condiciones ecológicas naturales (aguas alcalinas y temperaturas relativamente elevadas); las características de medios de cultivo sintéticos utilizados dentro de los ensayos de laboratorio y en gran escala, son igualmente indicados aquí con sus rendimientos obtenidos sobre su plan energético y material.

- Características Biológicas de la S. maxima.

La Spirulina actualmente cultivada presenta dos especies, S. platensis (Nordst) y S. maxima (Geitler); la primera es originaria de Kanem, Tchad y la segunda de México. Las Spirulinas son cianoesquisofitas procarióticas y aparentemente son bacterias por las particularidades de sus genosporas o "cromosomas". Las genosporas de las cianoesquisofitas están formadas de fibrillas probablemente lisas de DNA y no están unidas a las histonas, contrariamente a las de los DNA de los organismos eucarióticos. Este parentesco está acentuado por la ausencia en --

Las células de membranas perinucleares, de mitocondrias y de plastos. Por otra parte, estos organismos son aparentemente algas; precisando, son cloroplastos de algas rojas y está presente en ellos una serie de membranas clorofilianas que poseen dos sistemas fotoquímicos, como todos los vegetales. Uno de estos sistemas funciona en relación con la foto-oxidación del agua, que interviene como reductor en su fotosíntesis, debido a la posición de pigmentos accesorios azules y rojos, en la aproximación de algas azul-verdes, el color que predomina es el azul.

Valor Nutritivo

Su riqueza es remarcable en proteínas, de 64 a 70 % de la masa de la substancia seca y los otros constituyentes son también elevados:

Lípidos.....	5-7 %
Glúcidos.....	12 a 17 %
Substancias minerales.....	5 a 8 %

Las membranas Clorofilianas y el Sistema Pigmentario

Estas membranas forman el cromatoplasma: conjunto de sacos aplanados semejantes a sacos laminados de algas y de vegetales superiores. Estos sacos están formados por pliegues de una membrana lipoprotéica de 80 a 100 \AA de espesor; esta membrana posee dos conos sobrepuestos, uno comprende partículas de 80 \AA de diámetro (superficie Y) y las otras partículas de

150 Å (superficie X), en donde las partículas gruesas son a menudo alineadas regularmente y las alineaciones están a una distancia de 600 a 800 Å .

En el espectro de absorción de una suspensión de S. platensis a baja temperatura, en la región del violeta se distinguen diversos picos de bases en la región del rojo a 710, 697, 687, 677.5 y 668.5 nm, que corresponden a estos complejos clorofilianos u halocromos diferentes. Además existen otros pigmentos proteínicos del grupo de las biliproteínas. La base a 633 nm, corresponde a la aloficocianina y el pico de 631 nm, a la ficocianina que se encuentra en gran cantidad y es responsable de la coloración azul de los organismos. Estas biliproteínas constituyen dos gránulos de 550 Å , se observa esta disposición generalmente en las cianoesquisofitas, igualmente se encuentran en algas rojas.

Los carotenoides son abundantes en estas membranas, los cuales poseen además otros pigmentos ligados a reacciones fotoquímicas, ellos mismos captan electrones de transferencia que les acompañan: P 700, plastoquinonas, citocromos, plastocianina, ferredoxina; como lo muestra el funcionamiento fotosintético.

Las ficocianinas y las ficoeritrinas son parte importante de los diferentes complejos clorofilianos que forman antenas colectrices de fotones utilizados para la conversión de ener--

gía química en sus reacciones de oxido-reducción fotosintéticas; en sus membranas están presentes para intervención de centros activados tipo clorofila P 700 y sus transportadores citados anteriormente. Se cree que esto es para la reducción de CO_2 fijado por sitios enzimáticos de las regiones extramembranoides de las células. Algunas de estas membranas poseen espacios intersticiales como en las otras Cianofíceas.

Los transportadores de electrones de la cadena respiratoria de oxido-reducción son responsables de la oxidación terminal de la respiración celular. En donde los análisis electroforéticos de las membranas proteicas nos muestran que son más numerosos que los de las membranas correspondientes a las algas-rojas. (2), (13), (14), (15), (16), (25), (34), (35), (36), (39), (47), (52), (54) y (60)

III ECOLOGIA Y CULTIVO

Las "flores de agua" formadas por estos organismos en la superficie de los lagos de Tchad y de México, se cosechan fácilmente por su concentración. Las aguas en las que se desarrolla la Spirulina son ricas en bicarbonatos y carbonatos.

Así en la región del Tchad, contienen aproximadamente de 11 g/lit de HCO_3^- y 5 g/lit de $\text{CO}_3^{=}$ de sodio, además NaCl y Na_2SO_4 .

Su contenido total en sales es aproximadamente de 30 g/lit y el pH oscila alrededor de 10; en el Tchad estos organismos se desarrollan de Abril a Octubre, período de calor más intenso, ya que estos organismos requieren de temperaturas ligeramente elevadas.

Las condiciones de cultivo están marcadas por los experimentos hechos en el Instituto Francés del Petróleo, bajo condiciones de luz artificial y al aire libre en cultivos piloto, - en condiciones de salinidad y temperatura natural.

Las condiciones óptimas en el laboratorio las define Zarrouk: como un medio de cultivo que comprenda los elementos necesarios para los organismos autótrofos: N, P, Mg, S, Fe, K y Na. Los reportes óptimos para K/Na es = 5; como macroelementos a pesar de los NO_2^- y la urea, los medios formados por N_2 atmosférico y NO_3^- son mejores.

Los oligoelementos indispensables son: Ca, Cl, B, Mo, Mn,

Co, Zn y Cu.

El etilendiaminotetracetato (EDTA), se añade como elemento quelante con el fin de evitar la precipitación de cationes pesados.

La tolerancia de salinidad es muy grande (de 7 a 56 g/lit) y el pH óptimo es alcalino con un amplio rango que va de 8 a 11, donde los límites extremos están aproximados entre 7 y 11.3, con un poco de carbono, suministrado por medio de una corriente de aire que contenga CO_2 es muy favorable.

La temperatura óptima de cultivo está comprendida entre 32 y 40°C .

Con una iluminación efectiva (20 W/m^2), el tiempo de generación es de 9 a 10 hrs., cuando se lleva a cabo una iluminación elevada (120 a 140 W/m^2), no se debe aplicar por más de 7 hrs., ya que si se siguen estas indicaciones sería excelente para la fotosíntesis instantánea, pero si se pasa, se corre el riesgo de llevarse a cabo una solinización de pigmentos. Cuando el cultivo es de un espesor adecuado, la saturación lumínica está alrededor de 20 W/m^2 .

La exigencia cuántica medida por iluminación próxima a la saturación luminosa es de 23 fotones de luz blanca por una mol de CO_2 y así, asimila lo correspondiente a un rendimiento energético del 10 %.

La capacidad de la fotosíntesis es de 15 μm de CO_2 asimila-

tados por hora/mg de alga seca y equivalen a 340 ml de CO₂/hr-
/g de alga seca.

La capacidad de desarrollo de la Spirulina en condiciones de cultivo de laboratorio con una alteración de luz - obscuridad de 12 - 12 hrs, permite las condiciones para la producción teórica de 42 g de substancia seca por m²/día, en condiciones exteriores favorables, en particular, desde el punto de vista térmico, el rendimiento medio anual es de 12 g de substancia - seca por m²/día, este rendimiento es muy elevado si se tiene en cuenta, que en particular el valor energético medio de los compuestos de la síntesis predominantemente protéica, es independiente de su mismo valor nutritivo.

Los estudios del Instituto Francés del Petróleo permitieron encontrar un método de cultivo intensivo que da un rendimiento de 40 toneladas de biomasa seca (25 toneladas de proteínas), por hectárea y por año; rendimiento muy superior al de la agricultura tradicional en la que, en México, una hectárea de maíz rinde un promedio de 80 a 100 kilogramos de proteínas por cosecha. (8), (25), (34) y (49)

IV CARACTERISTICAS DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA Y VISIBLE

a) Efectos de la luz ultravioleta.

La radiación ultravioleta puede ejercer efectos fotoquímicos debido a que la energía de los fotones ultravioleta es realmente superior a la de los fotones visibles y además vecina a la energía de los enlaces covalentes constitutivos de las moléculas orgánicas.

Este tipo de efectos provoca: obscurecimiento de la piel, eritema, isomerización de la vitamina D y se presenta en los animales dependiendo de la calidad de la radiación U.V., sin embargo, la intensidad de la radiación U.V. solar, puede variar en forma importante entre los 290 y 400 nm, esto es, en función del espacio y otros factores; por ejemplo: las variaciones ligadas al coeficiente de adsorción de O_3 (ozono), éste coeficiente "K" disminuye en forma exponencial en función de la longitud de onda; establecida en 10^2 cm^{-1} a 280 nm. además es medible ($K = 1 \text{ cm}^{-1}$), a 320 nm. Por este hecho los efectos del ozono sobre la radiación U.V. solar, son sobre todo más sensibles en la U.V. baja, cuya intensidad es en consecuencia mucho más variada que la de U.V. alta solar.

Las variaciones de la intensidad de U.V. recibida del sol (variaciones diarias debido a la rotación de la tierra, variación anual lineal debido a la translación de la tierra, varia-

ción de la distancia tierra - sol, variación de la altura del sol), están fuertemente amortiguadas por las reacciones reversibles de la formación de ozono.

Las variaciones geográficas ligadas a la altitud y latitud, la disminución de la latitud o el aumento de la altitud tiene por efecto, en cosas iguales la tendencia a disminuir el espesor de la atmósfera y por consecuencia la absorción de U. V..

Las variaciones locales según el estado de la atmósfera (la absorción y difusión de los polvos, aerosoles y moléculas) así como, la de la topografía (reflexión por el sol y el medio ambiente).

La combinación de los efectos de estos factores han permitido explicar cuantitativa y cualitativamente las propiedades de la radiación U.V. solar, por ejemplo: la variabilidad relativamente baja de U.V. baja, en relación con U.V. alta, o bien la existencia de variaciones temperadas medidas en función de la latitud e intensidad de la radiación U.V..

Radiación U.V. artificial

La radiación U.V. artificial es producida en general por medio de arcos eléctricos, debido a un mecanismo inverso a la absorción celular: los átomos elevados en estados de excitación T^* , que regresan a su estado fundamental T_0 , emitiendo fotones en el espectro de energía $T^* - T_0$, es característico del

átomo emisor. Los tubos fluorescentes actuales comercializados son fundamentalmente compuestos por un arco de mercurio (el mercurio se vaporiza en el curso del funcionamiento a muy baja presión, 10^{-5} atms., en un gas inerte), en éstas condiciones el mercurio emite principalmente a la longitud de onda de 254-nm, si el vidrio del tubo es transparente a esta radiación, la sola radiación emitida por el tubo es la radiación denominada "germicida" y se coloca a 254 nm. Por el contrario, si el vidrio vuelve a absorber por medio de sustancias capaces de volver a emitir radiaciones "fosforescentes" de mayor longitud de onda, donde la emisión pueda ser desplazada desde U.V. hasta el visible.

- Calidad de la radiación U.V.

Para que la comparación de los efectos de fuentes U.V. diferentes sea válida, debe tomarse en cuenta en esos momentos la intensidad de la radiación recibida en cierto rango, pero también su composición cualitativa en longitud de onda. En efecto, los coeficientes de absorción de los diversos pigmentos son diferentes no solamente a la longitud de onda dada, sino que también varían con esta misma longitud de onda y se puede entonces esperar que no exista una relación sencilla dentro de la intensidad de la radiación U.V. de composición espectral

diferente y sus efectos biológicos. Por ejemplo, consideremos que en el rango U.V. bajo, los efectos atribuidos a la absorción por las proteínas y los ácidos nucleicos, los pigmentos absorben en forma diferente que en U.V. lejano, sin embargo a partir de 280 nm, sus espectros de absorción son prácticamente confundidos y esto sucede hasta los 320 nm, longitud de onda a partir de la cual su absorción se vuelve medible. El espectro de acción de U.V. bajo de la clorofila de las hojas inducidas por el U.V., así como también el de nombres de otros efectos biológicos, tanto en los animales como en los vegetales, se aparecen entre los 280 - 400 nm al espectro de absorción de las proteínas y ácidos nucleicos, atribuyéndose estos efectos a la absorción por estas moléculas que representa por consiguiente la efectividad biológica de la radiación U.V.

Esta energía extra es sobre todo válida si se compara con los efectos de dosis iguales de radiación U. V. de longitudes de onda muy diferentes, como es el caso de las lámparas germicidas y del sol en el U.V. bajo, dicha comparación aparenta ser muy difícil debido a la naturaleza de los pigmentos adsorbentes y a la intensidad de su absorción, que no es la misma a 254 nm, con respecto a U.V. bajo solar.

La absorción de los ácidos nucleicos es prácticamente el doble que la de las proteínas, además en el caso de la actividad fotosintética de los cloroplastos aislados, los efectos de

la radiación germicida parece llegar principalmente a las plas-
toquinonas y no sobre las proteínas y ácidos nucleicos.

También estas energías extras resultan válidas cuando se-
trata de comparar los efectos (algunas veces iguales) de una -
sola radiación U.V. baja solar, en donde numerosos factores lo
cales son susceptibles de modificar la forma del espectro de es-
ta radiación y en particular alrededor de los 300 nm, siendo -
esta su parte más activa, también en este caso las quinonas,--
plastoquinonas y las ubiquinonas, parecen ser los principales-
pigmentos responsables de los efectos que ejerce el U.V. bajo-
sobre el metabolismo energético de los cloroplastos y de las -
mitocondrias.

Sin embargo, ciertas modificaciones cualitativas del U.V.
bajo son particularmente sensibles en las zonas vecinas de los
290 nm, estas modificaciones son menores a partir de los 320 -
nm. Debido a esto la importancia de las energías extras concer-
nientes a la composición espectral de la radiación específica-
en el rango de U.V. alto solar es mucho menor. Por consiguien-
te, no se justifica la búsqueda de una relación eventual entre
las dosis suministradas de U.V. próximo por diferentes fuentes.

En el caso particular de los cultivos bajo invernadero, -
es conveniente no subestimar la importancia de los factores --
que contribuyen a modificar la composición espectral de la ra-
diación U.V. próxima, pues aparte del estado de las fuentes y-

de su envejecimiento, existen otros factores principales que dependen de los materiales que componen el invernadero ya que estos modifican los resultados, por ejemplo: la difusión de la radiación a nivel de las paredes, donde los fenómenos de difusión resultantes de la combinación de refracción y reflexión por las partículas han observado efectos que dependen de los ángulos de incidencia y de la longitud de onda de la radiación, así como de la naturaleza de la concentración y del tamaño de las partículas. En general, la intensidad de la difusión aumenta proporcionalmente al inverso de la potencia de la longitud de onda.

En conclusión, tomando en cuenta la gran energía de los fotones U.V. y sobre todo la variabilidad cualitativa y cuantitativa de estas radiaciones U.V., que dependen no solamente de los diferentes tipos de fuentes de luz, sino también del medio ambiente, de las plantas y de la diversidad de los pigmentos receptores; no es tan sorprendente encontrar que los efectos son completamente contradictorios atribuyéndose a radiaciones U.V.. Por lo tanto, el efecto de los fotones U.V. aumenta en el cultivo y es mayor que el efecto estudiado, haciendo intervenir un número mayor de factores; siendo así como se ha reportado que el U.V. inhibe, activa o modifica el crecimiento de las plantas y organismos.

- Efecto de la Radiación U.V. Sobre la Fotosíntesis.

Efectos del U.V. lejano sobre el aparato fotosintético. - Las primeras observaciones fueron hechas por Deherain y Siemens, las cuales fueron determinadas por medio de arcos eléctricos en donde se reconocieron los efectos de clorosis de células epidérmicas y también en las primeras células polisálicas con bandas verticales desorganizadas y obscurecidas en su contenido celular; la radiación de U.V. lejano produce también clorosis sobre las hojas de las plantas superiores.

Las observaciones fueron hechas sobre el aparato fotosintético y sobre las reacciones características de la fotosíntesis.

El flujo emitido por un tubo germicida G.E. de 60 cm de longitud con una intensidad aproximada a 10 mW/cm^2 , es sólo del orden de 0.5 mW/cm^2 a 30 cm de distancia, dicha intensidad disminuye con rapidez de acuerdo con el envejecimiento del tubo, ya que todo depende de la distancia de medición, que varía en forma inversamente proporcional a la distancia.

Se ha constatado que sobre hojas cortadas, una radiación breve, menor de un minuto es suficiente para provocar al cabo de dos días aproximadamente una clorosis del parenquima; las lesiones aparecen solamente si las hojas se conservan en la obscuridad, pero por el contrario, si las hojas se incuban ba-

jo luz blanca y sobre todo en U.V. alto de intensidad media, - dichos efectos no aparecen y se suscita un fenómeno de foto--- reactivación. Sin embargo, cuando las dosis son mayores, alrededor de 5 minutos, las lesiones ya son fotoreactivables; el - fenómeno de fotoreactivación (dosis débiles), se ha atribuido a la difusión a partir del epidermo, el cual es el único lesio nado en estas condiciones; donde también existen sustancias - hidrosolubles capaces de alcanzar parenquima y provocar cloro- sis.

Algunas observaciones fueron hechas sobre plantas enteras cultivadas al aire libre o bajo invernadero y recibiendo ade-- más de la luz solar, una radiación germicida durante un máximo de dos horas al día. En dichas condiciones se observó modifica^u ción de la ultraestructura de los cloroplastos y del número y tamaño de los gránulos osmófilos, así como de la estratifica-- ción de las clorofilas.

Posiblemente la importancia de estas lesiones varía mucho según las plantas y su actitud respecto a la fotoreactivación, la cual se probó en estas condiciones, resultando dicho efecto en mayor proporción en betabel y colirábano y disminuyendo en rábano y lechuga.

Se ha comprobado que una radiación relativamente baja, de algunos W/m^2 durante 5 minutos, es suficiente para reducir en un 75% la cantidad de CO_2 e incorporarlo más adelante por foto

síntesis bajo luz blanca. Un efecto similar ocurre en Chlorella, en la cual se observó, en estas mismas condiciones, una caída paralela de la fijación de CO_2 y del desprendimiento de O_2 ; aunque por ejemplo la resistencia a la actividad fotosintética es menor en Chlorella que en trigo y se cree que se debe a la protección que ejerce el efecto pantalla (efecto de filtro), debido a pigmentos no fotosintéticos situados en el epidermo de verdadera naturaleza polifenólica.

Reacciones análogas fueron hechas a nivel molecular sobre cloroplastos aislados, utilizando dosis relativamente fuertes de algunas decenas de W/m^2 durante decenas de minutos. Se ha comprobado que la sensibilidad de las diferentes actividades fotosintéticas "in vitro" (fotofosforilación cíclica y no cíclica, fotorreducción del ferrocianuro y del NADP), son diferentes. Deduciendo que la radiación germicida actúa específicamente sobre la actividad del fotosistema 2 y evidentemente sobre los dos sistemas.

Cuando la dosis recibida es alta, el espectro de acción de la fotoinhibición de la reducción de NADP por los cloroplastos "in vitro", puede ser establecido entre 230 y 700 nm lo que ha permitido comparar los efectos de la radiación visible y U.V..

En el visible a partir de 420 nm, el espectro de fotoinhibición corresponde a la absorción de pigmentos cloroplásticos-

(clorofila y carotenoides), pero el rendimiento cuántico es -- siempre bajo, al contrario del U.V., que es aprovechado en el momento; cuando el rendimiento cuántico es elevado la forma -- del espectro no corresponde ya a la absorción de pigmentos, --- sensibilizando así la fotoinhibición en el visible.

Se ha concluido que "in vitro", los efectos de la fotoinhibición de la fotosíntesis son particularmente sensibles en el U.V. y esto se debe a que su intensidad es mayor que la longitud de onda de los fotones, que es más corta.

Se demostró que la fotoinhibición por las radiaciones que produce una lámpara mixta la cual emite a la vez en el U.V. y en el visible (lámparas mixtas de arco y neón), está principalmente atribuida a las radiaciones ultravioleta.

La radiación germicida tiene por objeto, no sólo inhibir la actividad fotosintética sino también la de destruir paralelamente a las plastoquinonas; como las plastoquinonas parecen estar estrictamente asociadas al aceptor primario del fotosistema 2, se ha comprobado que es también más sensible a los efectos del U.V.. Se supone que los pigmentos responsables de la fotoinhibición en el U.V. deberían ser las plastoquinonas, aunque no se puede definir un solo tipo de pigmentos responsables de la fotoinhibición, porque según las longitudes de onda, diferentes pigmentos entre ellos las plastoquinonas, plastocianinas y difícilmente las proteínas contribuyen a este efecto.

En resumen, se puede afirmar que pequeñas dosis de radiación U.V. bastan para perturbar en forma sensible no solamente las actividades fotosintéticas, sino también la estructura del aparato fotosintético desde un punto de vista práctico; la efectividad de los fotones U.V. varía mucho con su longitud de onda, por lo tanto es indispensable controlar la calidad de estas radiaciones.

- Efectos de la Luz U.V. Sobre el Aparato Fotosintético.

Las radiaciones U.V. próximo inhiben por lo menos "in vitro" a la actividad fotosintética; dichos resultados tienen un interés fisiológico limitado puesto que la radiación U.V. próximo recibida "in vitro" por los cloroplastos dependen de la presencia en las hojas de polifenoles, que la absorben intensamente en este sector.

Los estudios del aparato fotosintético después de la irradiación con U.V. próximo, fueron hechos por microscopía óptica y electrónica. Se comprobó que las dosis bajas de U.V. próximo tienen un efecto estimulante sobre el crecimiento (5 W/ m^2 a razón de 2 horas por día), provocando un aumento de capas de parénquimas polisódicos en forma de banda; el número de cloroplastos en la célula y la frecuencia en sus divisiones, aumenta también la importancia de sus tilacoides y de su acoplamiento.

to. En estas condiciones, los cloroplastos cargados de almidón son dispersados normalmente en el citoplasma como lo están normalmente ó habitualmente bajo luz blanca. Algunos de ellos presentan un sistema de lamellas (láminas) concéntricas, este tipo de estructura es muy notable bajo luz U.V. próxima artificial, donde también se observan cloroplastos de plantas cultivadas en altitud de 2000 a 4000 m y desde luego bajo luz U.V. próxima natural más intensa.

Estas modificaciones ultraestructurales se acompañan evidentemente de modificaciones cualitativas y cuantitativas de su composición. En las hojas de tomate y pepino se ha observado que en dosis relativamente bajas, de algunos W/m^2 , complementada con la radiación solar, provoca un aumento en la concentración de clorofila y a la vez una disminución en la relación clorofila alfa - clorofila beta, bajo luz artificial y -- utilizando dosis de U.V. próximo relativamente más fuertes.

- Fotosíntesis Bajo Radiaciones U.V.

La existencia de la actividad fotosintética (desprendi--- miento de O_2 y fijación de CO_2), fue puesta en evidencia sobre varias algas en el U.V. próximo y en el U.V. lejano hasta los 220 nm. Es así, como en la Chlorella y la Ulvalactuca, fue posible caracterizar el desprendimiento del O_2 hasta los 220 nm,

esto a pesar de que las reacciones de fotoinhibición ocurrieron simultáneamente; parece ser que según la forma del espectro de acción del desprendimiento de O_2 puede ser contenido entre los 220 y 700 nm, y que la energía utilizada por la fotosíntesis en el U.V. a partir de los 220 nm sea completamente absorbida por las clorofilas. En general, en el U.V. próximo el rendimiento cuántico de la fotosíntesis de las algas, es sensiblemente constante o disminuye relativamente poco entre los 350 y 400 nm, por lo contrario alrededor de los 350 nm disminuye en forma repentina y brutal para volverse nula por debajo de los 300 nm.

La existencia de reacciones características de la fotosíntesis (reducción del NADP, fotofosforilación en presencia de PMS ó acoplada a la reducción del NADP), se observa a los 300-nm en los cloroplastos de espinacas "in vitro", la forma del espectro de absorción de estas tres reacciones, entre los 300- y 700 nm, es similar al espectro de absorción de las clorofilas y carotenoides presentes en estos cloroplastos. De los 3 casos, el rendimiento cuantitativo disminuye rápidamente a partir de los 400 nm, pero conviene señalar que la velocidad de ésta disminución es diferente para cada reacción; es así, como a 300 nm el número de quantums necesarios para la reducción de una molécula de NADP y para la formación conjunta de ATP, son respectivamente alrededor de 160 y 80 Q.

La radiación puede ser utilizada por la fotosíntesis, tomando en cuenta los efectos de fotoinhibición, su efectividad es más grande cuando es mayor su longitud de onda, sin embargo para que efectivamente la fotosíntesis tenga lugar "in vivo" , se necesita que el U.V. pueda llegar hasta los cloroplastos. --- Otros numerosos factores contribuyen a modificar "in vivo" la transmisión a las hojas del U.V. es desde luego el rendimiento de la fotosíntesis.

Se concluye, que tomando en cuenta la baja intensidad de radiaciones U.V. solar y el bajo rendimiento cuántico de la fotosíntesis de plantas al aire libre, se puede afirmar que la importancia del U.V. como fuente de energía utilizada por la fotosíntesis es baja en pleno campo. Por el contrario el rendimiento cuántico de plantas de invernadero puede ser mucho más elevado; y se supone que la importancia cuantitativa del U.V. bajo invernadero es grande, en los dos casos la efectividad del U.V. está limitada por las propiedades ópticas del epidermo y por la presencia de pigmentos epidérmicos no fotosintéticos que absorben U.V. a partir de los 400 nm, como por ejemplo: los polifenoles.

- Relación entre Polifenoles y Actividad Fotosintética bajo Luz Ultravioleta.

Los polifenoles, frecuentemente encontrados en las hojas -

de angiospermas, son los derivados hidroxilados del ácido cinámico (ácido fenil-propiónico) y de las flavonas (fenil 1,2 cromona). En general los flavonoides existen en forma de glucósidos solubles, mientras que los ácidos cinámicos están formados por ésteres ó glucósidos insolubles; éstos polímeros insolubles constituyen a la lignina de la lamella media. Dentro de los flavonoides y los derivados del ácido cinámico, los núcleos bencénicos están conjugados con carbonilos y un carboxilo como intermediario de doble enlace, por lo tanto la mayor conjugación está extendida y los máximos de absorción de los polifenoles están aproximadamente en el visible en donde generalmente hay mayor y más intensa absorción. Además, es notable que el aumento del número de sustituyentes tenga un efecto análogo a la extensión de la conjugación. Es conveniente agregar que la forma del espectro de absorción de los polifenoles depende no solamente de su estructura espacial (isómeros cis-trans), sino también de su estado de ionización. La ionización de los hidróxilos y carbonilos es en efecto, la mayor parte del tiempo idéntica a una extensión de la conjugación de polifenoles; se traduce por un desplazamiento hipercrómico de los máximos de absorción, de 30 a 50 nm en el visible.

Así, estos hechos contribuyen a hacer de los polifenoles foliares un filtro muy eficaz, tanto en el U.V. alto, en el cual absorben principalmente las flavonas, como en el U.V. ba-

jo en el cual absorben en mayor cantidad los ácidos cinámicos.

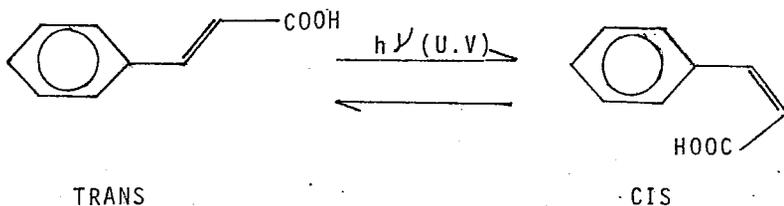
Los efectos de filtro que los polifenoles son susceptibles de ejercer, son más acentuados por su localización particular. Se ha verificado que las flavonas están presentes en grandes cantidades dentro de las vacuolas de las células epidérmicas, no encontrándose así, el ácido cinámico cuya localización está mejor ubicada, relacionada con la existencia total de los procesos de lignificación.

La forma de espectros de absorción del epidermo de hojas confirma bien ésta interpretación. La absorción de los epidermos en el U.V. no es tan intensa sino hasta los 420 nm aproximadamente. Su espectro presenta en resumen tres máximos entre 270, 320 y 370 nm, así como un mínimo entre los 300 nm, completamente análogo a los de los flavonoides y del ácido cinámico.

Ciertos polifenoles, ácidos cinámicos, cumarina y complejos metálicos de flavonas son fluorescentes en el azul, el violeta y hasta en el amarillo después de la absorción en el U.V. próximo, donde además ésta fluorescencia puede ser observada también en compuestos que están en solución acuosa o adsorbidos por la celulosa. Se supone que estos mismos polifenoles pueden emitir su fluorescencia "in vivo", por este hecho ellos pueden jugar el papel de sensibilizantes de la fotosíntesis por emisión de la luz visible y desde luego aumentar el rendimiento cuántico aparente del U.V.

A este primer grupo de efectos indirectos de los polifenoles sobre la fotosíntesis en el U.V. próximo es conveniente - agregar los efectos directos, donde se puede suponer la existencia sistemática de polifenoles, ya que está confirmado en los cloroplastos dentro de las numerosas posibilidades de inter-relación directa; lo que parece tener relación directa con la radiación U.V. es la activación de la ribulosa-difosfato-carboxilasa, por la radiación U.V. que necesita como cofactor del ácido clorogénico, que es uno de los derivados más frecuentes del ácido cinámico. Se supone que esta activación resulta de un efecto alostérico y que ello tiene lugar por isomerización cis - trans del ácido clorogénico, lo cual provoca un cambio de configuración de la enzima.

Reacciones análogas de regulación de enzimas efectuadas por isomerización cis - trans, fueron observadas y se ve que la fenil-alanina-amonioliasa está retroinhibida "in vitro" por su producto de reacción, el ácido trans-cinámico, más no por su isómero el ácido cis-cinámico, que se puede formar a partir del isómero trans por simple irradiación U.V..



Así el conjunto de propiedades fisicoquímicas de polifenoles vegetales, contribuyen a hacer de estas substancias unos pigmentos particularmente activos en el U.V. próximo, sus efectos de pantalla ó filtro favorecidos por la localización epidérmica preferida por los pigmentos más adsorbentes; además está reforzado por dos particularidades metabólicas:

Por una parte, los polifenoles tienen una localización sobre todo extracloroplástica, la cual reforza su efecto de filtro hacia los cloroplastos.

Y por otra parte, la concentración de los polifenoles en los vegetales aumenta generalmente cuando estos son cultivados bajo dosis relativamente bajas del U.V. próximo, comparables a las que se reciben del sol. Fueron comparados estos efectos de U.V. artificial con los de U.V. solar; en las hojas estos aumentos de concentración son en realidad muy sensibles para los ácidos cinámicos y todavía más para los flavonoides.

Es palpable que estos aumentos resulten de la elevación de la retroinhibición de la fenil-alanina-amonialiasa por isomerización del ácido trans-cinámico. Como quiera que sea, estos fenómenos contribuyen a atravesar el efecto filtro de los polifenoles. Es factible que el bajo rendimiento de la fotosíntesis bajo U.V. de las plantas en el campo, se deba principalmente a la absorción del U.V. por los epidermos, que resulta de la inducción de la biosíntesis de los polifenoles por estas mis

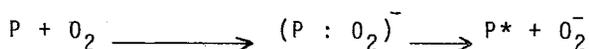
mas radiaciones.

Para resumir, conviene subrayar que las numerosas particularidades de la fisicoquímica, de la localización y del metabolismo de polifenoles, contribuyen a hacer más eficaz su absorción en el U.V., por lo tanto se reducen los efectos de esta radiación sobre el sistema de la actividad fotosintética.

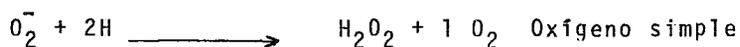
En conclusión, se puede afirmar que existen, al lado de los efectos de clorosis de células polisálicas, etc., provocados por fuertes dosis de U.V., otros efectos, debido a dosis más bajas, del mismo rango que se reciben del sol, modificando el ambiente, la estructura y desde luego la efectividad del aparato fotosintético. Tomando en cuenta las particularidades bioquímicas de los polifenoles, es factible atribuir a estas substancias un papel protector contra los efectos del U.V. Esta hipótesis es tanto más plausible que el hecho de sus propiedades antioxidantes.

Los polifenoles pueden así tener un papel protector contra las fotooxidaciones inducidas por las radiaciones U.V.; en particular esta protección se puede ejercer contra los efectos del ión superóxido (O_2^-).

La formación de iones O_2^- , tiene lugar en forma general por reducción monovalente de una molécula de O_2 por una molécula de cierto pigmento P que se manifiesta a un estado P^* excitado, o sea:

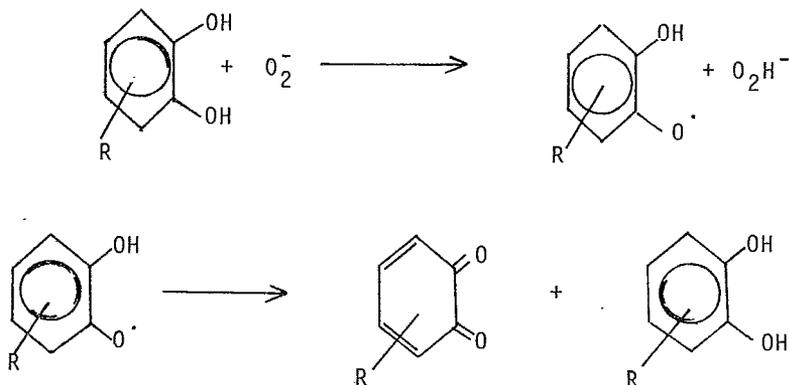


Este tipo de reacción puede tener lugar también en los --
 cloroplastos, por ejemplo: a nivel de aceptor final (ferredoxi
 na - liasa), del fotosistema I o de metaloflavoproteínas (fe--
 rredoxina-NADP-reductasa), que en el resto de la célula. La --
 frecuencia de estas foto-oxidaciones es mayor cuando se entra--
 en el rango del U.V. Las oxidaciones por $O_2^{\cdot -}$, son resultados de
 sus efectos directos, o sea de sus productos de dismutación y
 en particular del O_2 de la manera siguiente:



En los animales como en los vegetales existe, un sistema
 de protección enzimática para la super-oxido-dismutasa que cata
 liza la dismutación de los iones $O_2^{\cdot -}$, por una reacción global
 mente análoga a la precedente; pero con formación de oxígeno -
 triple ($3O_2$), que es mucho más reactivo que el oxígeno simple
 ($1O_2$), se puede suponer que en los vegetales, los polifenoles
 constituyen un sistema de protección contra los iones super --
 óxido, donde provocan la reducción al estado de iones hidroper
 óxido.

El ión hidroperóxido ($O_2H^{\cdot -}$), puede intervenir en la forma
 ción de ortofenoles (hidroxilación de monofenoles), y en su --
 oxidación (formación de quinonas).



En estas condiciones los polifenoles oxidados en semiquinonas, pueden formar desde quinonas y eventualmente desde productos oscuros de polimerización (melanoidinos). Este tipo de oxidación se observe "in vitro" con diversos polifenoles (adrenalina, dihidroxifenil-alanina, ácido caféico). Estas reacciones de "oscurecimiento de epidermo" fueron también observadas "in vivo", por Deherain entre otros autores, y tienen un mecanismo tal que da como resultado final el reforzamiento del poder absorbante de los epidermos y desde luego de su efecto de filtro pantalla. (12), (37), (54), (61).

V EXPERIENCIAS REALIZADAS

a) Adaptación del Medio

El procedimiento de adaptación se llevó a cabo durante ocho meses, en los cuales se proporcionaron las condiciones siguientes:

Se recolectaron nutrientes naturales del lago de Texcoco, para adaptarlos a un ambiente seminatural en condiciones de laboratorio en la Ciudad de México.

El medio de cultivo utilizado, consistió en salmueras del Lago de Texcoco, con suspensión algal con una concentración conocida, se depositó en un recipiente adecuado, que le pudiese proporcionar luz natural.

Se valoró la concentración inicial del alga Spirulina maxima, con el objeto de determinar la cantidad de nutrientes necesarios para la manutención de la cepa.

Cada tres días se le agregaban al medio, tres gramos de NaNO_3 (nitrato chileno) y dos gramos de Na_2CO_3 con el objeto de mantener un pH óptimo (pH = 9 - 11).

Se observó microscópicamente la cepa, para así, poder determinar el número de espirales promedio, esto con el propósito de darnos cuenta si el crecimiento, se inhibía o se mante-

nía normal.

Cada ocho horas se les suministraba aereación al medio - por aproximadamente 30' minutos, con el fin de dar una homoge- nización al cultivo y ayudar así, a una mayor y mejor capta- ción de CO_2 , para este propósito se utilizaba una bomba eléc- trica (como las usadas para peceras), el exceso de aereación- ayuda a la fragmentación del alga provocando un retardo en su crecimiento.

La medición de la temperatura se efectuaba tres veces al día, para detectarse así cambios bruscos de ésta y tomar las precauciones necesarias.

Al rompimiento del equilibrio biótico, se produce proli- feración de "pulgas de agua", mermando así, las condiciones - del medio y por consiguiente decreciendo la producción de Spi- rulina maxima, para evitar que sucediese esto, se incrementa- ba la concentración de $NaHCO_3$, en un 50%.

Cada tres días se recolectaba aproximadamente 20 g de -- Spirulina maxima, con el fin de prevenir la inhibición de su reproducción.

El volumen de agua se mantuvo constante, ya que el calor solar provoca evaporación del agua del medio, bajando el volu- men inicial, ocasionando esto una mayor concentración de sa- -- les saturando el medio y provocando una menor captación de -- CO_2 y de N_2 atmosférico.

El exceso de iluminación solar, produce una disminución --- en los micro y macro-nutrientes, lo cual hace que se liberen - los pigmentos del alga (Ficobiliproteínas, Caroteno, Xantofi-- las), ocasionando la lisis del alga por dicha degradación, y - se puede evitar, manteniendo constantes los niveles óptimos de los micro y macro-nutrientes (Fe, Co, Ni, Zn, Mn, Mg, V, etc.- NaHCO_3 , NaNO_3), y pH.

Se añade EDTA al 0.008% al medio para que ayude a un au-- mento en la densidad de éste, previniendo que la S. maxima se-- sedimente y no aproveche así, la luz natural del sol.

Después de éste tiempo se analizó el alga y se determinó - su condición inmejorable, trasladandose a un recipiente rectan-- gular de 60 lt de capacidad, material de vidrio, con el objeto de llevar a cabo la irradiación artificial por medio de una -- lámpara de luz negra con un rango de 3500 - 4700 °A, max. 4000 °A, para la realización del experimento. (3),(49),(*).

b) Importancia de la estructura y función de las Biliproteínas o Ficobilinas.

La presencia de estructuras laminares (tilacoides), es una característica común de la ultraestructura de las células que - funcionan con la fotosíntesis desprendiendo oxígeno.

En las células eucarióticas el laminado fotosintético esta contenido dentro de los cloroplastos y fuera de los complejos proteína-clorofila. Los tilacoides contienen: Citocromos, Ferredoxina, Plastocianina, Carotenoides, varias quinonas y -- una alta proporción de galactosilgliceridos, fosfolípidos. El volumen de las clorofilas dentro de los tilacoides sirve como un pigmento receptor de luz (antena).

La energía luminosa atrapada, es transferida de el pigmento antena a un complejo especializado; proteína-clorofila "centros de reacción", en donde es convertida a energía química. Los centros de reacción clorofílicos representan una pequeña - proporción (menor a 1%), de la clorofila dentro de los tilacoides.

En plantas verdes y algas verdes, los pigmentos antena incluyen complejos proteínicos de ambas clorofilas a y b, además en menor proporción también contribuyen los carotenoides. La luz en el rango de los 500 - 600 nm no es absorbida efectivamente por los pigmentos presentes en estos organismos. Así, - aproximadamente una tercera parte del espectro visible no es - explotada para fotosíntesis. Otras clases de algas, tienen --- pigmentos accesorios que absorben intensamente en el rango de los 500 - 600 nm. La energía luminosa atrapada por estos pigmentos es transferida a la clorofila a, para su utilización en fotosíntesis.

Pigmentos típicos accesorios incluyendo clorofila C_1 y C_2 en clases muy desarrolladas de algas eucarióticas; fucoxantina en diatomeas y dinoflagelados, los que contienen ficobiliproteínas de las algas procarióticas azul-verde (Cianofitas), la eucariótica alga roja (Rodofita) y las criptomonadales Criptoficeae), estos organismos contienen pigmentos accesorios y no, clorofila b.

Actualmente las ficobiliproteínas son las que más extensamente se han estudiado de todos los pigmentos accesorios fotosintéticos extra-tilacoidales.

Los grupos prostéticos de las ficobiliproteínas son tetrapirrólicos de cadena abierta. Las ficobiliproteínas de Cianofita y Rodofita contienen ficoeritrina, ficocianina o ambas, - como grupos prostéticos. (para ver estructuras, consultar apéndice fig. 1):

Las excepciones son: B y R ficoeritrinas; donde un tercer grupo prostético, la ficourobilina de estructura no determinada todavía, ha sido propuesto.

Los pigmentos accesorios como lo son: carotenoides, fucoxantina y piridina, presentan sin embargo, complejos de proteínas dentro de la célula y pueden ser removidos por extracción con solventes orgánicos. En contraste con los grupos prostéticos de las ficobiliproteínas que están covalentemente unidas a la fracción proteica.

Todas las algas azul-verdes contienen aloficocianinas y C ficocianina y las algas rojas, aloficocianinas y R ó C ficocianina. La mayoría de las algas azul-verdes y algunas rojas, necesitan ficoeritrina. Las ficobiliproteínas muestran el mayor rango de variación en sus propiedades espectroscópicas.

Examinando brevemente los parámetros que rigen la energía transferida, es apropiado considerar a las bases para --- creer que las ficobiliproteínas, en verdad sirven como pigmentos accesorios fotosintéticos.

El espectro de absorción máximo de ficoeritrina es de -- (max. 570 nm) y ficocianina (Max. 620 nm), el cual está bien diferenciado del de la clorofila a (max. 670 nm). La amplia separación de esta absorción máxima fue utilizada por Emerson y Lewis en 1942, en una clásica demostración de la alta eficiencia de la utilización de la energía absorbida por ficocianina en la fotosíntesis de un alga azul-verde Chroococcus sp. Emerson y Lewis (1942), compararon el rendimiento cuántico en la fotosíntesis (medido como oxígeno desprendido, por un quantum incidente, como una función de la longitud de onda de la luz), a varias longitudes de onda, con las proporciones de luz absorbida por los pigmentos componentes de la célula, en estas longitudes de onda. El rendimiento cuántico encontrado es de 0.085 a los 676 nm que es, en donde la clorofila absorbe el 94% y la ficocianina el 6% de la radiación incidente. En la --

región de los 560 - 640 nm, es en donde la ficocianina absorbe el 80 % y la clorofila sólo el 20 %, ahí el promedio de la eficiencia cuántica fué de 0.078. La determinación del espectro de acción por oxígeno desprendido por un número de algas rojas, estableció que la luz capturada por la ficoeritrina así como ficocianina, fué utilizada en fotosíntesis con eficiencia aprovechable del 100 % (Haxo y Blinks 1950; Blinks 1964). En células intactas del alga roja Porphyridium cruentum se demostró que la luz absorbida por la ficoeritrina sintetizó la fluorescencia de ambas ficocianinas y la de la clorofila a, sugiriendo así, la presencia de una vía de energía de transferencia que es el paso de la ficoeritrina a la ficocianina y de ficocianina a clorofila (French y Young 1952; Duysens 1952).

El mecanismo del proceso de energía transferida fué primeramente examinado por Arnold y Oppenheimer (1950), después de considerar el espectro de absorción de la ficocianina y la clorofila, Arnold y Oppenheimer (1950) concluyeron: que el sólo mecanismo, da importancia a la transferencia de energía de la ficocianina a clorofila y es la transferencia resonante de energía de un oscilador a otro en resonancia con él, de la eficiencia observada de transferencia, la distancia más probable entre la ficocianina y las moléculas de clorofila se ha estimado que es de 40 °A.

Por ahora, es generalmente aceptado que la migración de --

energía de las biliproteínas a clorofila a, procede de la energía de transferencia resonante.

La absorción de un fotón por una molécula, induce a una -remoción de la molécula, del estado basal a un estado electrónico excitado. La molécula sufre entonces, una rápida relajación terminal en el subnivel vibracional inferior, a un primer estado excitado simple, sin emisión de radiación.

El rango y la eficiencia de la energía de transferencia -exhibida por las ficobiliproteínas "in vivo", es muy alto ---- (apéndice, tabla 2); la evolución de estas proteínas está evidentemente culminada en moléculas las cuales sirven como excelentes atraparadoras de energía luminosa, llenando además, el -- punto óptimo del espectro de traslape.

Localización intracelular de las Biliproteínas en algas azul--verdes y algas rojas.

Las ficobiliproteínas son los constituyentes que están en mayor cantidad en las células de algas azul-verdes y algas rojas. En algunos organismos, como por ejemplo: Anacystis nidu--lans, ellas pueden representar cerca del 40% de la proteína cé--lular.

La elevada concentración de estas proteínas permite atrapar eficientemente los fotones con uniformidad en intensidades

de luz débil o baja.

El análisis de secciones delgadas de células de algas rojas, fijadas con gluteraldehído, revela la presencia de una -- formación regular de gránulos (ficobilisomas), en la superfi-- cie de la membrana externa de la lámina del cloroplasto (Gantt y Conti 1966;b;1966). Estructuras similares han sido demostra-- das en gran número de algas azul-verdes.

Los ficobilisomas de una alga azul-verde de la especie -- Nostoc, se prepararon por medio de un procedimiento similar al del gluteraldehído, las tres biliproteínas: ficoeritrina, fico-- cianina y aloficocianina, (presentes en estos organismo, se -- encontraron en partículas aisladas).

Los ficobilisomas de Nostoc parecen ser globulares con una base aplastada y mide cerca de 40 nm de diámetro hacia el si-- tío de adhesión con la lámina fotosintética. La conclusión an-- terior se ha basado en el estudio de la ultraestructura de las preparaciones de vesícula, obtenidas en la ausencia de deter-- gentes; en donde se cree que las partículas son ficobilisomas, las cuales se adhieren con la superficie de las membranas.

La información detallada de la ultraestructura de los fi-- cobilisomas y de la distribución de las biliproteínas resulta-- escasa. Pero es posible que el procedimiento de aislamiento -- pueda causar alguna pérdida de clase en la estructura.

La distribución de los ficobilisomas en las superficies -

de los tilacoides es estrictamente regular, ésta, presumiblemente refleja la presencia de un aparato que ordena los sitios de adhesión en la superficie externa de los tilacoides. Esta observación es supuesta por estudios de ultraestructuras en preparaciones congeladas de células de algas azul-verdes y algas rojas.

El rompimiento de las superficies de las membranas tilacoidales, revelan un patrón de gránulos a los cuales parecen estar íntimamente correlacionados con los ficobilisomas en la superficie externa de los tilacoides. Mediciones del espectro de acción muestran que las ficobiliproteínas concentran energía exclusivamente en el fotosistema 2.

Los estudios realizados apoyan el propósito de que el mejor curso de la energía transferida dentro de los ficobilisomas es :



por eso la clorofila a, y la distribución espacial de los pigmentos sigue la misma secuencia, por ejemplo: la ficoeritrina es la más distante de la superficie de la membrana, mientras que la aloficocianina está en justa proximidad a ella.

La conclusión derivada de estos estudios, en los que "in vivo" todas las ficobiliproteínas están reunidas en partículas,

las cuales son adheridas a la membrana que contiene a la clorofila, además la organización de las proteínas en el ficobilisoma parece ser consistente, con una disposición indicada por -- las propiedades espectroscópicas e individuales de las proteínas.

Ficocianinas.

Un tipo singular de pigmentos bilitreno es enlazado covalentemente a C Ficocianina; los cromóforos pueden ser removidos de la proteína por un número de procedimientos incluyendo hidrólisis con HCl conc. y a temperatura ambiente, metanólisis con reflujo en metanol al 90 %, otro método más reciente es, - fraccionar con bromuro de hidrógeno en ácido trifluoroacético a 75 °C.

El peso molecular de la ficocianina es de 586, basado en su estructura, sin embargo, el espectrómetro de masa, da en ficocianobilina un ion molecular a 588.

La composición de amino ácidos de la C ficocianina y de sus α y β subunidades, se presentan en la tabla 3 (apéndice).

El análisis de estos compuestos nos revela las siguientes características: primera, la remarcable y total similitud en la composición de amino ácidos de proteínas derivadas de organismos taxonómicamente no relacionados, segunda, el alto contenido

de residuos ácidos y alifáticos. La alanina está presente en -- una elevada cantidad y representa más o menos uno de cada 6 re-
siduos; ácido aspártico (más aspargina), cerca de uno de 10 re-
siduos, en cada una de las proteínas examinadas; estos 2 resi-
duos junto con la glicina, leucina, ácido glutámico (y glutami-
na) y serina representan aproximadamente el 50% de la composi-
ción de amino ácidos.

La composición de la subunidad alpha revela algunas caracte-
rísticas interesantes, las subunidades alpha de Synechococ-
cus sp., Aphanocapsa sp., Anabaena sp., Phormidium luridium y
Spirulina maxima, todas contienen un residuo de histidina; en
contraste, las beta subunidades de Mastigocladus laminosus y -
de Oscillatoria aghardii, la C ficocianina exhibe esta caracte-
rística. Esto sugiere que la asignación y designación de α y
 β subunidades de estas proteínas pueden haber estado inverti-
dos y/o contenido de cromóforos.

Propiedades Físicas de las Ficocianinas.

En la ruptura de células algales, las ficobiliproteínas -
son liberadas como agregados hidrosolubles de alto peso molecu-
lar. La medida precisa depende del organismo en estudio y de -
las condiciones de aislamiento, incluyendo el pH, fuerza ioni-

ca, temperatura, concentración de proteína y de la presencia o ausencia del detergente no iónico.

Comentarios concluyentes.

En comparación con otras cromoproteínas (Citocromos, Ferredoxinas, hemoglobina, etc.), las ficobiliproteínas son aún un grupo de proteínas muy poco estudiadas. Sin embargo, aún -- con la información limitada disponible, alguna correlación de estructura con función biológica es alcanzada para C ficocianina. Es fácil contar con el comportamiento para la agregación -- en términos funcionales; la agregación en ficobilisomas y la -- adhesión de estas estructuras a las láminas fotosintéticas es enviada en vista de la dependencia del radio R^{-6} y eficiencia del proceso de la energía transferida. El hexámero $(\alpha\beta)_6$ de C ficocianina es definitivamente un intermediario en el montaje del ficobilisoma. El hexámero absorbe en un máximo de 621 -- nm con una E_M de $330\ 000\ M^{-1}cm^{-1}$, en donde el monómero $(\alpha\beta)$ absorbe a 615 nm con un E_M de $23\ 000\ M^{-1}cm^{-1}$. (16), (29), (33), (36), (37), (41) y (47).

Ficocianinas híbridas.

Las diversas propiedades de las C ficocianinas, sugieren --

una remarcada conservación en la estructura de esta clase de -- proteínas. Este fenómeno es notable en dos aspectos; las algas azul-verdes son en su mayoría los organismos más antiguos en -- la tierra, microfósiles morfológicamente indistinguibles de -- las actuales Cianobacterias, han sido encontrados en formacio- nes, sobre 2.6 billones de años (Schopf 1970; Schopf et al. -- Licori y Cloud 1972).

Es una suposición plausible que las ficobiliproteínas son igualmente antiguas, claro está, una correlación razonable pue de ser aducida entre las propiedades de absorción de las bili- proteínas y el espectro de energía de luz transmitida a través de la atmósfera de la tierra primitiva (Tilden 1935). La dis- tribución de biliproteínas homólogas, completa la laguna entre células procariotes y eucariotes. Este contenido no depende so lamente de las evidencias físicas e inmunológicas acerca de su estructura, aunque solo con los datos de la secuencia parcial- de amino ácidos en C ficocianina y de células eucariotes y pro- cariotes, se enfatiza que las divisiones Cianofita y Rodofita, abarcan una enorme variedad de grupos de organismos. Igualmen- te entre las Cianobacterias unicelulares, las Choroccales; el porcentaje molecular de guanina, más citosina de sus DNAs, cu- bren una extensión completa, casi tan extenso como el diámetro total de la bacteria no fotosintética (Satine et al. 1971). Contra este último es de interes explorar las razones para la -

aparente, remarcada y revolucionaria estabilidad de la estructura de la ficocianina. Es claro que la conformación de una ficobiliproteína, tal como la C ficocianina pueda satisfacer un número de requerimientos; la necesidad a conferir especial ambiente y conformación en cada uno de los tres cromóforos, representa una mayor limitación en variación estructural. La fuerza de este argumento puede ser fácilmente apreciado, sobre la observación de la relativa invariabilidad en el carácter de residuos en contacto con el Heme en citocromos C, de un muy amplio rango de organismos (Margoliash 1971; Takano et al 1973). Esta analogía es particularmente apropiada, puesto que la apoproteína del citocromo C es similar en subunidades a la de las biliproteínas, por la obvia similitud química entre el heme y los grupos prostéticos de la biliproteína.

Un requerimiento más en ficocianina es el de contactos -- muy específicos entre las α y β subunidades, para asegurar la apropiada separación y orientación de los cromóforos. Otras -- restricciones son impuestas por la necesidad de formar ($\alpha\beta$)_n agregados de estructuras definidas y la necesidad de interac---tuar con las aloficocianinas y con las ficoeritrinas, si esta presente.

La hipótesis de la estructura tridimensional de ficocianina es muy conservadora; ha sido ensayada como solución con respecto a un nivel de organización. Se ha demostrado que las fico

cianinas híbridas consisten de α y β subunidades en un radio de 1:1. Sus propiedades cromatográficas, espectro de absorción y comportamiento con un enfoque isoeléctrico fueron consistentes, y se concluyó que estas moléculas poseyeron una estructura tridimensional muy similar a la de las proteínas nativas -- (Glazer y Fang 1973 b). Este estudio demuestra que la conformación y los importantes contactos en las subunidades de α y β han sido muy conservados a través de la larga historia evolucionaria de C ficocianina. (37).

- Procedimientos Analíticos.

Aislamiento y Purificación de Biliproteínas.

Las biliproteínas contenidas en el alga se liberan cuando las estructuras celulares se destruyen y son suspendidas en una solución buffer o en agua destilada. Para la purificación de los pigmentos hidrosolubles, el extracto acuoso es centrifugado para remover los fragmentos celulares. Estas operaciones se efectuarán en frío y en la obscuridad.

La destrucción de las estructuras celulares se realiza -- por método mecánico: maceración en mortero. Para evaluar la -- cantidad de pigmento extraído se calcula por espectrofotometría de absorción en el visible.

La longitud de onda de absorción máxima varía según la -- naturaleza del solvente y cada sustancia presenta varios picos de absorción máxima, que son características de ellos para las medidas cuantitativas. Así la concentración real de la sustancia en el líquido de extracción es obtenida por medio de una curva de calibración, establecida a partir de cada uno de los pigmentos en estado puro.

Algunas de estas sustancias son difíciles de aislar, por lo tanto se recurre a una estimación en valor relativo por relación a un índice; esta necesidad de elección de sustancias de referencia proporciona la longitud de onda de absorción máxima que es vecina a la de los pigmentos del alga.

Sustancia de referencia	Longitud de onda nm	Pigmento correspondiente. nm
Verde de Malaquita en sol. acuosa.	617	Ficocianina (610)
Azul de Metileno en Sol. acuosa.	585	Ficoeritrina (585)

La medida de la densidad óptica en función de la concentración conocida de estos compuestos nos permite establecer las curvas de calibración. (ver apéndice),(41),(44)

Material

- 1 mortero
- 1 agitador mecánico
- 1 probeta
- 1 matraz aforado de 100 ml
- 1 centrífuga
- 4 tubos para centrífuga
- papel Whatman No. 1
- 1 equipo de diálisis
- 1 refrigerador
- 1 espectrofotómetro

Condiciones óptimas de extracción:

- a) La presencia de NaCl, en determinada concentración permite la difusión del pigmento creando un choque osmótico. Concentración: 40 g/l (4%).
- b) Tiempo de agitación mínima: 1 hora 30 min.
- c) pH 7.2
- d) Relación alga/solvente: 1.6/100.

Reactivos

Solución de Cloruro de Sodio al 4%

Pesar exactamente 4 g de cloruro de sodio Q.P. y disolverlos en 100 ml de agua destilada.

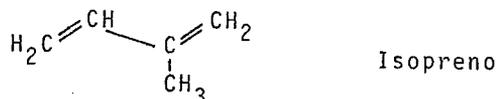
Método

Pesar exactamente 0.8 g de alga seca, macerar perfectamente bien en el mortero, suspender en 46 ml de solución salina al 4% y agitar durante una hora y media; protegiendo de la luz y manteniendo la temperatura baja. Centrifugar a 3500 r.p.m., durante 5 minutos para separar los fragmentos celulares. El sobrenadante se pasa a través de papel filtro Whatman No. 1, una vez terminada la filtración adicionar 4 ml de sol. de cloruro de sodio al 4% al papel para lavar el residuo. Dializar el filtrado en agua destilada y mantener la temperatura entre 4-6°C durante 12 horas, para purificar las biliproteínas. En la solución ya dializada se evalúa la concentración de pigmentos leyendo en la longitud de onda correspondiente (617, 585 nm), extrapolando la lectura de la densidad óptica en la curva de calibración.

c) Importancia de los Carotenoides y Compuestos relacionados.

Con este nombre se conoce a algunos pigmentos de origen natural de color amarillo, naranja o rojo, (la yema de huevo,

el cuerpo amarillo del ovario, el suero sanguíneo contienen colorantes de esta clase). Son de estructura alifática ó alicíclica, compuesta de unidades de isopreno.



Las series de dobles enlaces conjugados constituyen el sistema cromofórico de los carotenoides; cada uno de los extremos de la molécula está constituido por un anillo de ciclohexano no saturado y sustituido. Son insolubles en el agua y solubles en solventes orgánicos; fácilmente fijan el oxígeno del aire. Actúan como precursores de la vitamina A en los mamíferos; con el ácido sulfúrico y tricloruro de antimonio dan coloraciones que van del azul, violeta, al verde.

Clasificación y estructura:

La familia de los carotenoides está constituida por más de cien compuestos de estructura similar, existen por lo tanto muchos isómeros.- alfa-carotenos, beta-carotenos, gamma-carotenos. Ellos pueden clasificarse en tres grupos:

- 1) Hidrocarburos insaturados de fórmula general: $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$, compuestos de 11 a 13 dobles ligaduras, en su mayoría conjugadas. En este grupo el que más predomina es el beta-caroteno, el cual al hidratarse con dos moléculas de agua se desdobra en dos moléculas de un alcohol monovalente pentaolefínico (vitamina A)
- 2) Derivados reductos que se manifiestan con fórmula $\text{C}_{40}\text{H}_{60-76}$.

3) Los compuestos derivados oxigenados denominados Xantofilas- (alcoholes, ácidos carboxílicos y epóxidos), frecuentemente se encuentran en forma de esterres. Son los productos de la- protección de los carotenoides a la luz y el oxígeno molecu- lar.

- Carotenoides Algales.

A) Su distribución encontrada en la división Cianofita se presenta en la siguiente tabla:

(Estudio realizado en Spirulina platensis, publicado por J. C. Palla - F. Busson). (37)

Pigmentos	% en la fase insaponificable
Beta-caroteno	79,3
Ficoxantina	9,25
Equinona	1,6
Beta-criptoxantina	4,45
Criptoxantina	1,15
4-Ceto,3 hidróxi- beta-caroteno	1,10
Zeaxantina	3,2

Se observa que el pigmento que más predomina es el beta--

caroteno y hay diversidad en las xantofilas.

B) Los carotenoides de las algas azul-verdes son encontrados junto con otros pigmentos fotosintéticos en la región periférica a los protoplastos (Fogg, 1950), en un sistema de estructura fotosintética indefinida denominada cromatoplasma (Thomas, 1960).(41)

- Procedimientos Analíticos

El primer paso en la preparación de muchos carotenoides puros, es la extracción de una fuente natural. Esta extracción es con un solvente orgánico en frío. Otros métodos involucran maceración en mortero con un solvente o extracción con solvente en caliente (metanol o etanol, por ejemplo). Posteriormente son transferidos a un solvente hidrocarbonado (éter de petróleo), - adicionándole alguna solución salina (NaCl, $(NH_4)_2SO_4$); en la fase alcohólica se encuentran las xantofilas (hipofase) y los carotenoides están presentes en el éter de petróleo (epifase). Para separar los ésteres de xantofilas, la solución de carotenoides se saponifica con solución de hidróxido de potasio alcohólica (de preferencia se mantiene a temperatura ambiente o por debajo) y las xantofilas resultantes son separadas de los carotenoides por partición entre el éter de petróleo y alcohol acuoso. Los pigmentos son separados por cromatografía en columna. Todas las ope

raciones se efectuarán protegidas de la luz y tan rápido como sea posible.

Se deben utilizar solventes puros, para minimizar la destrucción de los carotenoides y hasta donde sea posible las operaciones se conducirán en una atmósfera inerte. (17)

Material

1 mortero de porcelana

1 balanza analítica

Embudos de separación

Columna para cromatografía de aprox. 1 cm de diámetro interno

Matraces Erlenmeyer

Matraces aforados de 50 y 100 ml

Espectrofotómetro

Reactivos:

Adsorbente. Magnesia activada-Tierra de diatomeas (1:1).

Eter de petróleo. Grado Reactivo

Solución metanólica de KOH al 40%

Disolver 40 g de KOH en 100 ml de metanol (p/v).

Sulfato de Sodio anhidro Q.P.

Extracción:

Triturar la muestra perfectamente en un mortero, pesar -- exactamente 2.5 g, adicionarle 100 ml de metanol, mezclar per-

fectamente y mantener protegido de la luz. Transferir el extracto a un embudo de separación y adicionar 100 ml de éter de petróleo, agregarle 2 ml de solución alcohólica al 40% de KOH. Separar las fases y correr las cromatografías.

Separación de pigmentos.

Se prepara una columna de cromatografía constituida por magnesia activada y tierra de diatomeas (1:1) como adsorbente, mezcla satisfactoria para la separación de estos pigmentos. Un tapón de fibra de vidrio se inserta en la construcción antes de la llave de paso de la columna, que está constituida por un tubo de vidrio de aproximadamente 1 cm de diámetro interno. El adsorbente en seco es empacado, rellenando de 2 a 2.5 cm de una sola vez, antes de adicionar una nueva porción de adsorbente, la capa superior de la porción previa se quiebra ligeramente con una espátula. La altura total de la columna será aproximadamente de 10 cm; la columna termina con una capa de 1 cm de sulfato de sodio anhidro para remover las trazas de agua del éter de petróleo usado para la cromatografía. Se adicionan de 25-50 ml de éter de petróleo a la columna, se deja que el solvente empape la columna lentamente a su paso por el adsorbente usando succión ligera si fuera necesario. Cuando el sulfato de sodio este cubierto con éter de petróleo, la columna esta lista para su uso.

La fracción insaponificable que contiene el caroteno se extrae del hidrolizado con tres porciones de 50 ml de éter de

petróleo. El extracto de éter de petróleo es lavado con agua hasta que los lavados esten libres de alcalí; concentrar el extracto y llevar a un volumen exacto de 100 ml. Las soluciones se guardan protegidas de la luz y se evaluan tan pronto como sea posible. 1 ml de la solución de éter de petróleo es pipeteado a la columna y se le permite correr, al mismo tiempo si es posible desplazar el aire sobre la columna con nitrógeno. Cuando la solución de caroteno alcance el tope de la columna se lava directamente con porciones de 5 a 10 ml de éter de petróleo; el eluido es cuidadosamente recolectado y se afora a 50 ml con éter de petróleo.

Para la evaluación de Xantofilas se trabaja con la fase alcohólica, preparando la columna de igual forma pero usando como solvente el metanol.

Cuantificación del eluido.

Cada eluido es transferido a un matraz aforado de volumen apropiado y diluido con el solvente. Determine la absorbancia de las soluciones (en la absorción máxima), tan rápido como sea posible en un espectrofotómetro calibrado.

Cálculos:

Carotenos.

$$C = \frac{\text{Absorbancia a } 436 \text{ nm} \times F \times 454}{196 \times L \times W}$$

Donde:

C= mg de caroteno/ libra en la muestra original

F= factor de corrección por volumen ocupado por el agua y la solución metanólica de KOH (0.95 para 2 g de muestra, 0.935 ml para 4 g de muestra).

L= longitud de la celda en cm

W= (gramos de muestra original/100 ml) X

Volumen de extracto

Volumen final

Xantofilas

$$Xa = \frac{\text{Absorbancia a } 475 \text{ nm} \times F \times 454}{235 \times L \times W}$$

Donde:

Xa= La concentración de Xantofilas en mg/lb en la muestra original

F, L y W significa lo mismo que se anotó anteriormente

(*) (55)

d) Importancia de la estructura y función de las Clorofilas.

Todas las células fotosintéticas contienen uno o más tipos de la clase de pigmentos verdes conocidos como clorofilas, pero no todas las células fotosintéticas son verdes; las algas fotosintéticas y las bacterias pueden ser pardas, rojas o púrpuras. Esta variedad de colores se debe a que además de la clorofila muchas células fotosintéticas contienen miembros de otras dos clases de pigmentos que capturan la luz: los carotenoides amarillos y las ficobilinas, azules o rojas, denominadas frecuentemente pigmentos accesorios.

La estructura de la clorofila a fué establecida mediante estudios de degradación por Willstätter y Hans Fischer en Alemania, y comprobada inequívocamente por síntesis total llevada a cabo por Woodward en 1960. La clorofila a (figura 2, apéndice) contiene cuatro anillos pirrólicos sustituidos, uno de los cuales (el IV) está reducido. Los anillos pirrólicos se hallan dispuestos en una estructura macrocíclica, en la que los cuatro átomos de nitrógeno centrales se hallan coordinados con un ión Mg^{2-} para formar un complejo esencialmente planar, muy estable. La clorofila posee una cadena lateral terpenoide larga e hidrófoba, formada por el alcohol denominado fitol, esterificado por un resto de ácido propiónico, que es un sustituyente en el anillo cuatro. Cuando se separa el fitol de la clorofila a por hidrólisis, la estructura residual recibe el-

nombre de clorofilida a que es un intermediario en la biosíntesis de la clorofila.

La clorofila a en forma pura, disuelta en acetona, muestra un máximo de absorción a 663 nm. En la célula intacta sin embargo, la clorofila a puede mostrar dos ó más máximos de absorción diferentes, por ejemplo: 672 y 683 nm. Además la posición exacta del pico de absorción de la clorofila a varía de unas especies de plantas a otras. Las diferencias no se deben a la existencia de diferentes formas moleculares sino que se reflejan, aparentemente la proximidad relativa de las moléculas de la clorofila a a otras moléculas de pigmentos de las membranas tilacoides. A diferencia de los citocromos en la célula intacta las clorofilas no están conjugadas con las proteínas.

Todas las clorofilas absorben la luz visible con eficacia gracias a sus muchos dobles enlaces conjugados. Además, la energía luminosa de los fotones absorbidos por la clorofila puede llegar a deslocalizarse y a difundirse por toda la estructura electrónica característica de la molécula de clorofila.

Los pigmentos accesorios que poseen máximo de absorción a longitudes de onda distintas de las clorofilas, actúan como receptores de la luz suplementarios para porciones del espectro que no están cubiertos completamente por la clorofila. Los ca-

rotenoides actúan también protegiendo a la clorofila del ataque degradativo del oxígeno molecular.

Las células eucarióticas así como las Cianofíceas, realizan la fotosíntesis en los tilacoides, vesículas aplanadas que se encuentran en el interior de los cloroplastos y están apiladas en forma de grana.

Las células fotosintéticas contienen tres tipos de pigmentos que actúan en la captura de la luz: Clorofilas, Carotenoides y Ficobilinas. (40),(45)

- Procedimientos Analíticos.

Material

1 balanza analítica
1 mortero de porcelana
1 matraz Kitasato
1 buchner
1 alargadera
1 manguera para conectar el vacío
Papel filtro Whatman No. 40
Espectrofotómetro.

Reactivos

Acetona acuosa al 85 %

Acetona acuosa al 80 %

Na_2CO_3

Método

Extracción

Seleccionar la muestra cuidadosamente, asegurándose que sea representativa del total de la biomasa, homogeneizar perfectamente la muestra.

Pesar de 1 - 5 g y ponerlos en un mortero, adicionar 0.1-gramo de Na_2CO_3 , macerar con la mano del mortero y triturar perfectamente durante 10 min. después se adiciona una pequeña cantidad de acetona acuosa al 85 % y continuar la maceración hasta que la muestra se observe finamente molida, pasar la mezcla a un matraz Kitasato y filtrar por succión, lavar el residuo con porciones de 20 a 30 ml de acetona al 85%, tres veces.

Procedimiento.

1.- A una muestra de 0.08 ml, adicione acetona acuosa al 80% hasta 10 ml de volumen final. Mezcle cuidadosamente y filtre a través de papel filtro Whatman No. 1 ó centrifuge durante 5 minutos.

2.- Leer D.O. a 645 nm contra blanco de agua.

3.- Leer D.O. a 645 x 5 = concentración de clorofila en mg/ml de suspensión.

Nota:

Para determinar las concentraciones de clorofila a y b -- más que la clorofila total como se mostró antes, prepare el extracto de acetona como se indica y lea D.O. a 649 y 665 nm.

Cálculo:

$17.72 \times \text{D.O. } 649 - 2.39 \times \text{D.O. } 665 = \text{Chla microgramos/ml de extracto total.}$

$20.11 \times \text{D.O. } 649 - 5.18 \times \text{D.O. } 665 = \text{Chlb microgramos/ ml de extracto total.}$

e) Importancia y Características de las Proteínas

Las proteínas son polímeros de amino ácidos, unidos covalentemente entre el nitrógeno del grupo amino de un amino -- ácido y el carbono del grupo carboxilo de otro, a dicho enlace se le denomina peptídico.

Se le llama polipéptido, a las cadenas de amino ácidos de un peso molecular hasta de 10 000 y arriba de éste, ya se les denomina proteínas.

Las proteínas se clasifican en dos clases: fibrosas y globulares.

Las fibrosas son insolubles en agua; las globulares son - solubles en agua o en soluciones acuosas de ácidos o sales.

Las proteínas fibrosas, son largas, tipo fibras, debido a

su conformación, cada cadena de polipéptidos está unida a otra en muchos puntos por enlaces de hidrógeno, las proteínas fibrosas que contienen cistina forman enlaces covalentes disulfuro- y para que se puedan romper estos enlaces intermoleculares se emplean solventes muy fuertes.

Las proteínas globulares adquieren formas esferoidales debido a dobles ocasionados por enlaces de hidrógeno en la misma molécula, de tal forma que la parte hidrofóbica queda en el interior y la hidrofílica al exterior, las fuerzas intermoleculares son relativamente débiles.

Las proteínas fibrosas constituyen el material estructural en los tejidos animales, por ejemplo; la queratina, proteína de la piel, uñas, cuernos, pezuñas, lana y plumas; la colágena, es la proteína del tejido tendinoso, la miosina es la proteína del músculo y la fibrosina de la seda.

Las proteínas globulares tienen acciones diversas en el funcionamiento de los sistemas biológicos, formando hormonas, enzimas, anticuerpos, parte del tejido sanguíneo; como la hemoglobina que es transportadora de oxígeno.

La calidad de las proteínas en el aspecto nutritivo la define, su solubilidad y la composición de sus amino ácidos esenciales, por ejemplo; la proteína de la harina de pluma contiene abundantes amino ácidos esenciales, sin embargo, por ser proteína fibrosa es insoluble y su calidad como alimento es --



muy baja.

Todas las proteínas de origen vegetal son deficientes en algún amino ácido esencial. (32), (40), (50).

- Procedimientos Analíticos

Material y Métodos

Material

Aparato de digestión y destilación macro Kjeldahl

3 matraces Kjeldahl de 800 ml

3 matraces Erlenmeyer de 500 ml

2 buretas de 50 ml

2 probetas de 250 ml

2 probetas de 50 ml

1 gotero

papel filtro Whatman # 1

Reactivos

Solución indicadora (mixta)

150 ml de solución valorada de HCl 0.1 N

130 ml de solución valorada de NaOH 0.1 N

90 ml de H_2SO_4 conc.

390 ml de NaOH al 40 %

45 g de K_2SO_4 anhidro

3 g de CuSO_4
30 g de granalla de zinc
6 g de parafina
600 ml de agua destilada

Método

Pesar una cantidad equivalente a 0.04 g de nitrógeno 4.0 g de muestra y pasarla a un matraz Kjeldahl.

Agregar 15 g de K_2SO_4 anhidro, más 1 g de CuSO_4 adicionan d \underline{a} se al matraz Kjeldahl.

Se miden 30 ml de H_2SO_4 conc. y se agregan al Kjeldahl - lentamente resbalanco por las paredes.

Se coloca el matraz en el digestor macro Kjeldahl hasta - clarificar (color verde esmeralda), se deja enfriar.

Se agregan aproximadamente 200 ml de agua destilada al ma - traz, y se agita bien para enfriarlo.

Se adicionan 130 ml de NaOH al 40% e inmediatamente se -- agregan 10 g de granalla de zinc y 2 g de parafina.

Se coloca inmediatamente en el aparato de destilación ma - cro Kjeldahl.

Se recibe el destilado en un matraz Erlenmeyer de 250 ml - con 50 ml de HCl 0.1 N, se recogen aproximadamente 200 ml de - destilado.

Se le agregan 10 gotas de indicador mixto y se enfría, --

se titula con NaOH 0.1 N hasta el vire de color canela a incoloro.

Cálculos:

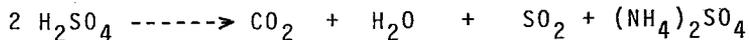
$$\frac{V \times N \times \text{mEq} \times 10}{\text{PM}} = X \quad \frac{X \times 100}{16} = X' \quad ; \quad X' \times 6.23 = Y$$

Y = % de nitrógeno orgánico.

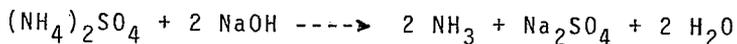
Fundamento:

Este método se basa en lo siguiente: primeramente, se lleva a cabo una reacción de oxidación-reducción por medio de un oxidante fuerte, H_2SO_4 conc. esta reacción se efectúa durante la digestión, los compuestos que contienen carbono son oxidados a CO_2 y H_2O por el H_2SO_4 reduciéndose éste a SO_2 , el SO_2 reduce al nitrógeno proveniente de compuestos orgánicos e inorgánicos a NH_3 , éste en presencia de H_2SO_4 se convierte en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

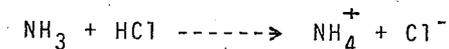
Reacción:



Obtenido el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se hace reaccionar con una solución de NaOH al 40% para formar NH_3 :

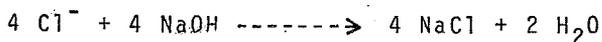


El NH_3 obtenido como gas, se destila por arrastre de vapor y se recibe en una solución de HCl 0.1 N



El HCl cede un protón al NH_3 que es una base y se forma el ion amonio y el ion cloruro. En virtud de que por cada átomo de nitrógeno presente se forma un ion cloruro, éste puede neutralizarse con una solución valorada de NaOH y en forma indirecta, conocer el contenido de nitrógeno.

Reacción de neutralización:



Cuando todo el Cl^- ha sido neutralizado se termina la reacción, cuyo punto final es señalado por un indicador.

(32), (33), (40), (50).

f) Importancia y Generalidades de las Vitaminas.

Las características nutritivas del alga Spirulina maxima nos dá pie para inclinarnos sobre la importancia en la determinación de vitaminas que componen a dicha alga, ya que ayuda a balancear los requerimientos nutricionales del individuo, ante la crisis de alimentos ricos en proteínas y vitaminas: Por tal caso el alga Spirulina maxima es una fuente importante en el futuro, para abastecer de alimentos saludables y económicos a

La población humana y animal. En la tabla 3 del apéndice, se presentan los requerimientos diarios de vitaminas recomendados en la dieta diaria y el contenido de éstas, en el alga Spirulina.

La determinación Química y Microbiológica de vitaminas -- del complejo B y ácido nicotínico, se llevan a cabo debido a la importancia Bioquímica de éstas, dentro del metabolismo humano y a la facilidad de cuantificación en el alga Spirulina.

Importancia de la determinación Microbiológica de las Vitaminas.

Los métodos microbiológicos para la determinación de vitaminas se basan en la necesidad que tienen algunos microorganismos específicos, de multiplicarse y producir ciertos productos metabólicos en presencia de vitaminas.

En ciertos casos el papel fundamental ó sitio exacto donde actúan dichas sustancias se ha localizado, observándose que requieren de éstos factores en pequeñísimas cantidades, y que invariablemente la respuesta del microorganismo a la adición -- en orden creciente de pequeñas cantidades corresponde a una línea recta.

Estos microorganismos se cultivan en medios nutritivos óptimos, si por el contrario son inoculados sobre medios que ca-

rezcan de la vitamina específica todo el desarrollo será inhibido. Cuando el substrato de características vitamínicas sometido a investigación es adicionado al medio inicialmente claro, la multiplicación del microorganismo causará una turbidez que puede ser medida turbidimétricamente. El aumento de la turbidez por los productos metabólicos formados por el microorganismo -- en un tiempo determinado, puede medirse cuantitativamente; ya que la mezcla de ácidos producidos por la degradación de la glucosa del medio en el metabolismo microbiano, puede ser titulada. La cantidad de vitamina presente, será directamente proporcional al incremento de la turbidez del medio, debido al aumento en la concentración de la solución tipo. Los efectos causados por la adición de la solución problema, pueden ser comparados con una solución testigo.

La mayoría de las cepas utilizadas, son adaptaciones naturales incapaces de producir ellas mismas ciertos factores de crecimiento esenciales. La probabilidad de que ellas, bajo ciertas condiciones ambientales pueden obtener la habilidad de sintetizar dichos factores de crecimiento no se excluye totalmente; para evitar esto es preferible usar mutantes incompletas, en las cuales esta habilidad no es obtenida, debido a la inducción de un gen artificialmente defectuoso; por ejemplo: cepas de Neurospora crassa y Escherichia coli.

Las necesidades que deben ser satisfechas para que el método

do sea reproducible y confiable son las siguientes:

- a) El microorganismo debe ser específico para cada una de las vitaminas que se estén determinando.
- b) Las propiedades del cultivo del microorganismo, deben permanecer constantes después de efectuar varios subcultivos.
- c) Las características de desarrollo y formación de productos metabólicos, ocasionan una degradación y por lo tanto pueden -- cuantificarse dentro de los rangos óptimos en la determinación.
- d) Se requiere de un microorganismo con características metabólicas aceleradas, para que el análisis pueda realizarse en el menor tiempo posible.
- e) Los microorganismos deben ser no patógenos, para que el analista este expuesto a un mínimo de riesgos. (7), (24), (38), (55). (apéndice cuadro No. 1).

Características e Importancia de la Vitamina B₂ (RIBOFLAVINA).

La Riboflavina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y una fuente muy rica de este vitamín son las bacterias anaerobias fermentativas.

Constituyen excelentes fuentes de riboflavina, la leche, el hígado, los riñones y el miocardio; en los cereales se presenta un contenido bajo de ella, durante la germinación de la avena, trigo, cebada y maíz la concentración de riboflavina au-

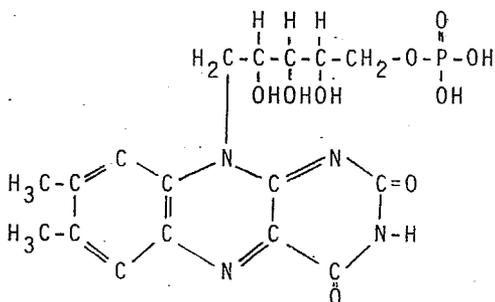
menta notablemente.

La vitamina es relativamente termoestable y muy sensible a la luz, por lo cual la determinación deberá llevarse a cabo en total ausencia de luz. La riboflavina se presenta como un constituyente de varios sistemas enzimáticos que intervienen en el metabolismo, estas enzimas se denominan flavoproteínas y actúan como coenzimas para la transferencia de hidrógeno en las reacciones catalizadas por estas enzimas (deshidrogenación).

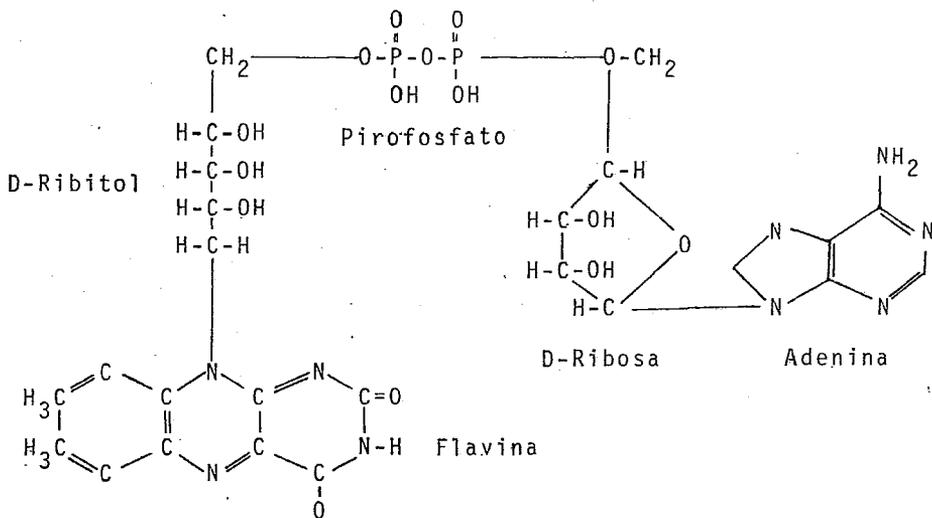
La vitamina existe en dos formas en los diversos sistemas enzimáticos, la primera es el fosfato de riboflavina (riboflavinmononucleótido, como se muestra en la figura), la cual es un constituyente de la enzima amarilla de Warburg, de la citocromoc reductasa y de la aminoácido-deshidrogenasa de los L-aminoácidos. La segunda forma es el flavinadenindinucleótido (FAD, como se muestra en la figura), que constituye el grupo prostético de la diaforasa, de la D-aminoácido deshidrogenasa, de la glicinoxidasa y de la xantiloxidasa; así mismo forma parte del grupo prostético de la acil-coenzima A deshidrogenasa, enzima que interviene en el primer paso de la oxidación de los ácidos grasos de bajo peso molecular como el ácido butírico.

La deficiencia de riboflavina puede llegar a producir lesiones características en los labios, fisuras en las comisuras labiales (queilosis), dermatitis seborreica localizada de la cara, un tipo especial de glositis (lengua magente) y ciertas -

alteraciones orgánicas y funcionales de los ojos. (4), (18), (31), (40), (57).



Fosfato de riboflavina
(riboflavinmononucleótido)



Flavinadenindinucleótido (FAD)

- Procedimientos Analíticos.

Material

Tubos de ensaye de 16 x 150 mm.

Pipetas de 1 ml, estériles

Pipetas de 5 ml, estériles

Pipetas de 10 ml, estériles

Matraz aforado de 100 ml

Matraz aforado de 1000 ml

Matraz Erlenmeyer de 250 ml

Mechero

Asa bacteriológica

Balanza analítica

Autoclave

Baño María

Refrigerador

Centrífuga

Estufa de cultivos

Espectrofotómetro

Algodón

Papel pH

Papel filtro Whatman No. 40

Papel aluminio

Papel de china negro

Reactivos

Micro-Assay Culture Agar B 319 (Difco)

- Bacto Micro-Inoculum Broth.

- Bacto Riboflavin Assay Medium B 325 (Difco).

- Solución patrón de riboflavina.

Pesar 100 mg de riboflavina U.S.P. y disolverlos por calentamiento en agua destilada, aforar a 1000 ml. La concentración de la solución patrón será de 100 microgramos/ml.

- Solución tipo de riboflavina.

Tomar 1 ml de la solución patrón y aforar a 1000 ml con agua destilada. La concentración de la solución tipo será de 0.1 microgramos/ml.

- Solución de Acido Clorhídrico 0.1 N.

- Solución amortiguadora de Acetato de sodio estandarizada a un pH de 4.6.

- Solución de Acetato de sodio 2.5 M.

- Solución de Cloruro de sodio al 0.9 %.

- Papaína, actividad proteolítica 1:350

- Diastasa, formadora de maltosa con actividad de 1:250.

- Microorganismo de Prueba: Lactobacillus casei ATCC 7469.

Método.

- Cultivo del microorganismo de prueba.

El cultivo de Lactobacillus casei ATCC 7469, se prepara -

por inoculación en picadura, de 3 tubos de Micro-Assay Culture Agar B 319 y una incubación a 37 °C durante 24 horas. Uno de los tubos de cultivo se utilizará para la conservación de la cepa, los otros 2 tubos se utilizarán para elaborar el inóculo.

Para el uso del microorganismo en el análisis, se procede a efectuar 10 transferencias sucesivas a partir del cultivo original, en tubos de Micro-Assay Culture Agar, en un período de 2 semanas. Preparar los cultivos frescos cada segundo día y no utilizar los que se prepararon a partir del cultivo original -- después de 4 días, se incuba de 24 a 48 horas a una temperatura de 37 °C.

- Inóculo.

La preparación del inóculo se realiza por un subcultivo de 24 a 48 horas de la última transferencia mencionada con anterioridad, en 10 ml de Bacto Micro-Inoculum Broth.

Después de 24 horas de incubación a una temperatura de 35 - 37 °C, las células son centrifugadas en condiciones asépticas y el líquido sobrenadante es desechado. Resuspender las células de este cultivo en 10 ml de solución de NaCl al 0.9% - estéril, centrifugar y tirar el líquido sobrenadante, repetir este proceso 3 veces.

Las células son diluidas 1:20 con solución de NaCl al 0.9%. Una gota de esta última suspensión es usada en la inoculación de cada uno de los tubos del análisis.

- Extracción de la muestra.

Debido a que las vitaminas se encuentran en forma combinada por ejemplo; en productos naturales, éstas pueden ser liberadas por medio de una hidrólisis ácida ó enzimática.

HIDROLISIS ACIDA.

Para la hidrólisis ácida se pesan 5 gr. de muestra (Spirulina fresca) y se homogeneizan con 80 ml de ácido clorhídrico 0.1 N en un matraz aforado de 100 ml, la suspensión se somete a 15 lb. de presión en un autoclave durante 15 - 20 minutos, se deja enfriar y se ajusta el pH de la solución a 4.5 con solución de Acetato de sodio 2.5 M. Se afora a la marca con agua destilada, se clarifica la solución por filtración o centrifugación. De esta forma tendremos nuestra vitamina ya liberada en la solución clarificada.

HIDROLISIS ENZIMATICA

En la hidrólisis enzimática se homogeneizan 5 gr. de muestra (Spirulina fresca), en 80 ml de solución reguladora de Acetato de sodio estandarizado a un pH de 4.6, en un matraz aforado de 100 ml. Se adicionan 50 mg de papaína y 50 mg de diastasa; la solución se incuba a 37°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se calienta la suspensión durante 30 minutos a 100°C en baño maria, se deja enfriar y se afora a la -

marca con agua destilada; clarificar la solución por filtra---
ción ó centrifugación.

Como en la hidrólisis ácida, en la solución ya clarifica-
da tendremos nuestra vitamina ya liberada.

- Curva de calibración.

La curva de calibración se prepara a partir de una serie
de diluciones conteniendo concentraciones de riboflavina en -
intervalos de 0.025, 0.050, 0.075, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.30 mi-
crogramos/ml. La concentración de la solución patrón de vita-
mina B₂ requerida para la preparación de la curva es de 100 -
microgramos/ml y la concentración de la solución tipo será de
0.1 microgramos/ml. (Gráfica No. 3 del apéndice).

-Evaluación.

- 1.- Preparar una serie de tubos, conteniendo las diluciones es-
pecificadas para la curva de calibración, como se muestra
en la Tabla No. 4 del apéndice.
- 2.- Para el problema, tomar 1 ml del extracto preparado de la
muestra y trabajarlos en forma paralela a la curva de cali-
bración.
- 3.- Adicionar a todos los tubos (Incluyendo el Problema), 5 ml
de Bacto Riboflavin Assay Medium B 325, estéril.
- 4.- Esterilizar en autoclave durante 10 minutos a 15 lb. de --
presión ó 121°C.

- 5.- Agregar una gota de inóculo a cada tubo, de la dilución -- 1:20 previamente preparada.
- 6.- Incubar de 18 - 24 horas a una temperatura de 35 - 37°C.
- 7.- Terminado el tiempo de incubación, la turbidez de las solu- ciones se mide en un Espectrofotómetro a 536 nm contra --- blanco de reactivo.
- 8.- Los valores obtenidos en D.O. se grafican contra la concen- tración; la lectura de D.O. del problema se extrapola en - la curva obtenida. (4), (5), (24), (55), (56), (58), (*).

NOTA: Debido a la sensibilidad que presentan las vitaminas, to- das las determinaciones deberán efectuarse en total au- sencia de luz.

Cálculos.

Concentración teórica de vitamina B₂ en el alga Spirulina maxima: 40 mg/ Kg de Spirulina seca. (*)

40 mg de Riboflavina en 1 Kg de Spirulina seca, equivalen a 40 mg de Riboflavina en 10 Kg de Spirulina fresca.

Cantidad de muestra empleada: 5 gr de Spirulina fresca.

40 mg ---- 10 000 gr.

$$X \quad \text{----} \quad 5 \text{ gr.} \quad X = \frac{40 \text{ mg} \times 5 \text{ gr}}{10 \text{ 000 gr}} = 0.02 \text{ mg.}$$

En 5 gr de Spirulina fresca tenemos una concentración teórica

de 0.02 mg (20 mcg) de vitamina B₂, contenidos en un volumen de 100 ml.

20 mcg ---- 100 ml

X ---- 1 ml

$$X = \frac{20 \text{ mcg} \times 1 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0.2 \text{ mcg}$$

En 1 ml de extracto tendremos 0.2 mcg de Riboflavina.

Volumen de extracto a utilizar: 1 ml.

Concentración teórica en 1 ml de extracto es de 0.2 mcg de Riboflavina. (6),(*).

- Importancia y Características de la Vitamina B₁₂ CIANOCOBALAMINA).

El vitamín B₁₂ se conoce como factor antianemia perniciosa ó factor extrínseco de Castle. En la figura se muestra la estructura química del vitamín.

La porción central de la molécula está formada por 4 anillos pirrólicos reducidos y numerosas substituciones que rodean a un solo átomo de cobalto. Se presentan varios derivados del vitamín debido a la substitución del grupo cianuro (unido coordinadamente al átomo de cobalto), llamadas cobalaminas cuya actividad biológica es idéntica al vitamín B₁₂.

Aunque se había sospechado que el vitamín B₁₂ funciona como una coenzima en el metabolismo, no se había logrado probar hasta que Barker y cols (1953) aislaron de fuentes microbianas 3 coenzimas que contenían vitamín B₁₂. Estas funcionan como -- coenzimas cobamídicas en el metabolismo, principalmente la DBC (5, 6 dimetilbenzimidazol cobamida) la cual desempeña un papel esencial como agente transportador de hidrógenos en la reacción reductasarrribonucleótido cobamida dependiente, en la cual la - fracción de ribosa de un ribonucleótido es convertida en desoxirribosa cuando se va a formar DNA. Se ha demostrado que las cobamidas también catalizan la conversión enzimática, en sistemas bacterianos, del glutamato en β metilaspártato y en los tejidos animales catalizan la reacción de la isomerasa en la --- cual la metil-malonil CoA es convertida en succinil- CoA.

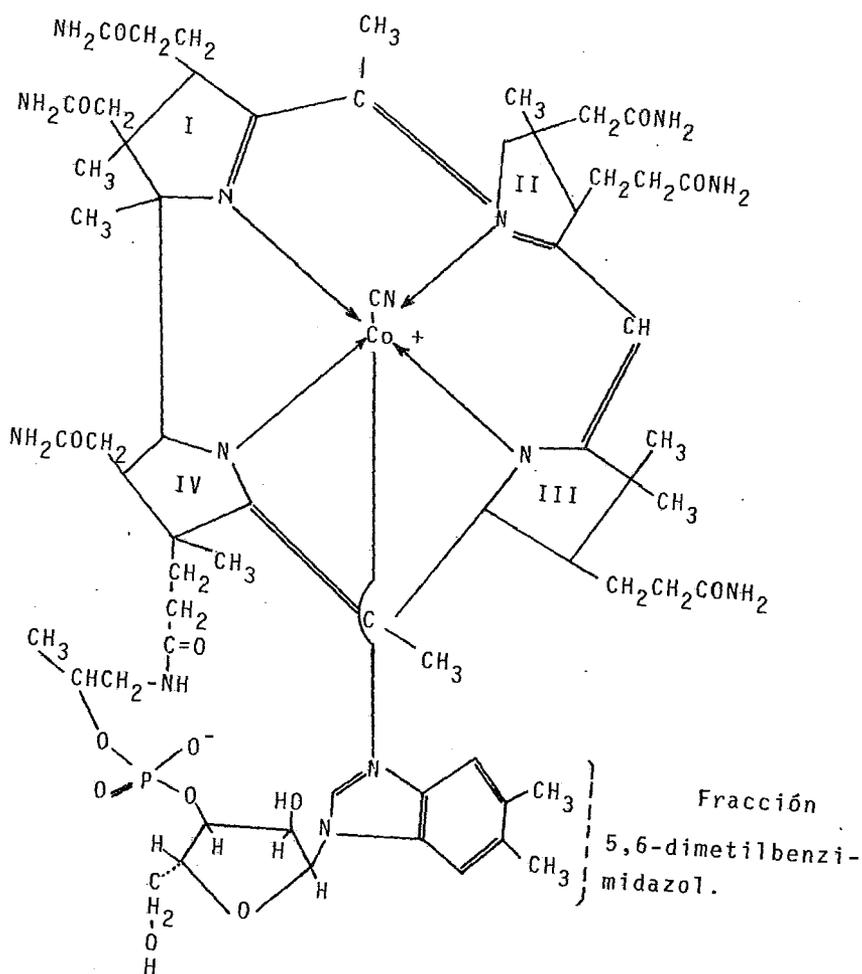
Otros experimentos han sugerido que el vitamín interviene en la síntesis de los ácidos nucleídos (posiblemente en la metilación de la uridina a timidina) y también en la síntesis de proteínas en los ribosomas. Se ha hecho referencia al papel -- del vitamín B₁₂ como cofactor en la conversión de ribonucleótido a desoxirribonucleico.

El signo más característico de una deficiencia de vitamín B₁₂ en el hombre es el desarrollo de una anemia macrocítica o de lesiones características del sistema nervioso (o ambas la llamada "enfermedad combinada de sistemas"). Los síntomas neu-

rológicos pueden sobrevenir en estados de carencia del vitamín B₁₂ antes del desarrollo de la anemia. En general, puede concluirse que cuando el aporte de vitamín B₁₂ es bajo, la demanda del tejido hematopoyético para este vitamín excede la de cualquier otra función fisiológica clínicamente reconocible. La macrocitosis es, por tanto, un indicador sensible de una deficiencia de vitamín B₁₂.

El vitamín B₁₂ cristalino resiste temperaturas de 100°C durante largos períodos y sus soluciones acuosas a un pH de 4 a 7 pueden ser esterilizadas en autoclave con muy poca pérdida de su actividad.

El contenido de ésta vitamina en los alimentos es muy bajo, sus fuentes en la dieta son predominantemente alimentos de origen animal, siendo los más ricos el hígado y los riñones, los cuales contienen de 40 a 50 mcg/100 g. La carne maciza, la leche, el queso y los huevos contienen de 1 a 5 mcg/100 g. El contenido de vitamín de los productos de las plantas superiores es casi ó totalmente nulo. (1), (4), (18), (31), (40), (57).



Cianocobalamina: Vitamín B₁₂
(C₆₃ H₈₈ O₁₄ N₁₄ PCo)

- Procedimientos Analíticos -

Material.

Consultar método anterior

Reactivos.

Micro-Assay Culture Agar B 319 (Difco)

Bacto B₁₂ Assay Medium USP B 457 (Difco)

Bacto Micro-Inoculum Broth

Solución patrón de Cianocobalamina.

Pesar 200 mg de cianocobalamina U.S.P. y disolverlos en una solución alcohólica al 25% (250 ml de Alcohol etílico y 750 ml de agua destilada) y aforar a 1000 ml. La concentración de la solución patrón será de 200 microgramos/ml.

Solución tipo de Cianocobalamina.

Tomar 1 ml de la solución patrón y aforar a 1000 ml con agua destilada.

Tomar de ésta nueva dilución 25 ml y aforar a 100 ml con --- agua destilada. La concentración final de la solución tipo - será de 0.05 microgramos/ml.

Solución de Acido Clorhídrico 0.1 N.

Solución amortiguadora de Acetato de Sodio estandarizada a - un pH de 4.6.

Solución de Acetato de Sodio 2.5 M.

Solución de Cloruro de Sodio al 0.9 %.

- Papaína, actividad proteolítica 1:350.
- Diastasa, formadora de maltosa con actividad de 1:250.
- Microorganismo de Prueba: Lactobacillus leichmannii ATCC 7830
Método.
- Cultivo del microorganismo de prueba.

El cultivo de Lactobacillus leichmannii ATCC 7830, se prepara en igual forma que el cultivo de Lactobacillus casei. Consultar método anterior.

- Inóculo:

La preparación del inóculo se realiza por un subcultivo de Lactobacillus leichmannii, en 10 ml de Bacto Micro-Inoculum Broth. Acompañado de una incubación de 24 horas a una temperatura de 35 - 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, las células son centrifugadas en condiciones asépticas y el líquido sobrenadante es desechado. Resuspender las células de este cultivo en 10 ml de Bacto B₁₂ Assay Medium USP B 457 estéril, centrifugar y desechar el líquido sobrenadante, repetir este proceso 3 veces; finalmente resuspender las células en 10 ml de medio estéril.

Adicionar 0.1 ml de esta suspensión en 10 ml de Bacto B₁₂ Assay Medium USP B 457 estéril y mezclar. La suspensión de células así obtenida será nuestro inóculo.

- Extracción de la muestra-

Debido a las características Fisicoquímicas de la vitami-

na, su extracción se puede realizar utilizando los 2 tipos de hidrólisis: hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática.

- Curva de calibración.

La curva de calibración se prepara a partir de una serie de diluciones conteniendo concentraciones de cainocobalamina en intervalos de 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.125, --- 0.150 y 0.200 microgramos/ml. La concentración de la solución patrón de vitamina B₁₂ requerida para la preparación de la curva, es de 200 mcg/ml y la concentración de la solución tipo final será de 0.05 mcg/ml. (Gráfica No. 4 del apéndice).

- Evaluación.

- 1.- Preparar una serie de tubos, conteniendo las diluciones especificadas para la curva de calibración, como se muestra en la Tabla No. 5 del apéndice.
- 2.- Para el problema, tomar 5 ml del extracto preparado de la muestra y trabajarlos en forma paralela a la curva de calibración.
- 3.- Adicionar a todos los tubos (Incluyendo el problema), - 5 ml de Bacto B₁₂ Assay Medium USP B 457, estéril.
- 4.- Esterilizar en autoclave durante 5 minutos a 15 lb. de -- presión ó 121 °C.
- 5.- Agregar una gota de inóculo a cada tubo, de la dilución - 1:100, previamente preparada.
- 6.- Incubar de 20 - 24 horas a una temperatura de 35 - 37 °C.

- 7.- Terminado el tiempo de incubación, la turbidez de las soluciones se mide en un Espectrofótopmetro a 546 nm contra blanco de reactivo.
- 8.- Los valores obtenidos en D.O. se grafican contra la concentración; la lectura de D.O. del problema se extrapola en la curva obtenida. (1),(4),(5),(24),(55),(56),(58),(*).

Cálculos.

Concentración teórica de vitamina B₁₂ en el alga Spirulina maxima: 2 mg/Kg de Spirulina seca. (*)

2 mg de Cianocobalamina en 1 Kg de Spirulina seca, equivalen a 2 mg de Cianocobalamina en 10 Kg de Spirulina fresca.

$$\begin{array}{l} 2 \text{ mg} \quad \text{---} \quad 10 \text{ 000 gr.} \\ X \quad \quad \text{---} \quad 5 \text{ gr.} \end{array} \quad X = \frac{2 \text{ mg} \times 5 \text{ gr}}{10 \text{ 000 gr}} = .001 \text{ mg.}$$

En 5 gr de Spirulina fresca tenemos una concentración teórica de .001 mg (1 mcg) de vitamina B₁₂, contenidos en un volumen de 100 ml.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mcg} \quad \text{---} \quad 100 \text{ ml} \\ X \quad \quad \text{---} \quad 5 \text{ ml} \end{array} \quad X = \frac{1 \text{ mcg} \times 5 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0.05 \text{ mcg.}$$

En 5 ml de extracto tendremos 0.05 mcg de cianocobalamina.
Volumen de extracto a utilizar, 5 ml.

Concentración teórica en 5 ml de extracto es de 0.05 mcg.
de Cianocobalamina. (6), (*).

- Características e Importancia, del Acido Nicotínico.

La niacina y la niacinamida son los agentes específicos para el tratamiento de la pelagra aguda. La primera se conoce como factor P-P (que previene la pelagra) como lo denominó originalmente Goldberger.

La niacinamida interviene en el funcionamiento de 2 coenzimas. Estas coenzimas son la coenzima I o Difosfopiridinucleótido (DPN) y la coenzima II o Trifosfopiridinucleótido (TPN).

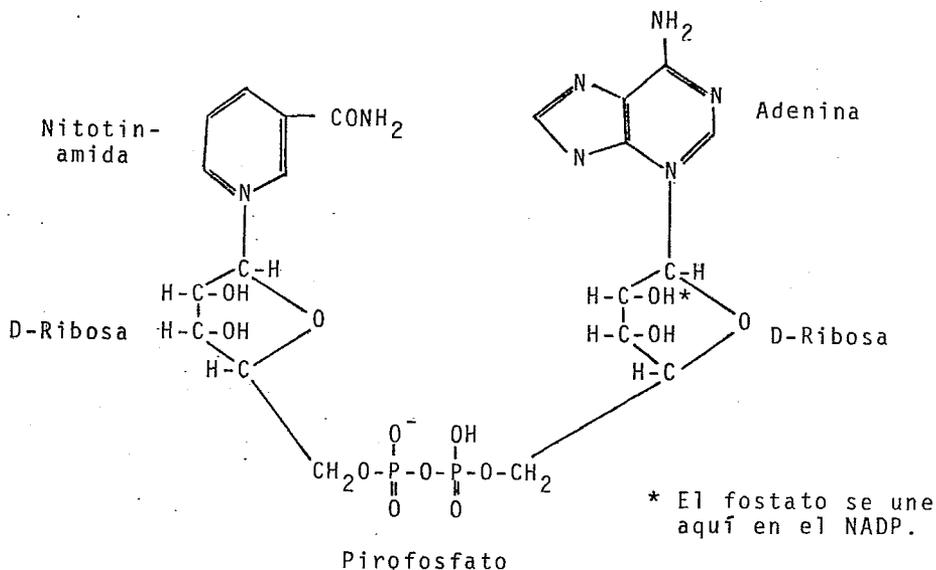
La comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica, ha recomendado recientemente que las dos coenzimas -- que contienen niacinamida sean designadas con nombres que describan con mayor exactitud su estructura química. Así, ha propuesto que el DPN sea llamado nicotinamida adenindinucleótido (NAD, como se muestra en la figura) y fosfato de nicotinamida adenindinucleótido (NADP, como se muestra en la figura) a la coenzima II (TPN). Estas coenzimas actúan como transportadoras de hidrógeno y de electrones debido a su oxidación y reduc

ción reversible, juegan un papel esencial en el metabolismo.

Se ha demostrado que el aminoácido Triptófano normalmente contribuye al aporte de niacina al organismo.

La niacina se encuentra con mayor abundancia en las levaduras y son buenas fuentes de ella las carnes magras, el hígado y la carne de aves. La leche, los jitomates, el salmón enlatado y varios vegetales de hojas verdes, proporcionan cantidades suficientes de vitamín para evitar que se produzca la enfermedad por carencia, aunque ellas en sí mismas no constituyan buenas fuentes del vitamín. (18),(31),(40),(57).

Nicotinamida adenindinucleótido
(NAD) forma oxidada.



- Procedimientos Analíticos.

Material.

Consultar método anterior.

Reactivos.

Micro Assay Culture Agar B 319 (Difco)

Bacto Micro-Inoculum Broth

Bacto Niacin Assay Medium B 322 (Difco)

Solución patrón de ácido nicotínico

Pesar 25 mg de ácido nicotínico U.S.P. y disolverlos en agua destilada, aforar a 1000 ml. La concentración de la solución patrón será de 25 microgramos/ml.

Solución tipo de ácido nicotínico.

Tomar 1 ml de la solución patrón y aforar a 100 ml con agua destilada.

Solución de Acido Clorhídrico 0.1 N.

Solución amortiguadora de Acetato de sodio estandarizada a un pH de 4.6.

Solución de Acetato de Sodio 2.5 M.

Solución de Cloruro de sodio al 0.9 %.

Papaína, actividad proteolítica 1:350.

Diastasa, formadora de maltosa con actividad de 1:250.

Microorganismo de Prueba: Lactobacillus plantarum ATCC 8014

Método.

- Cultivo del microorganismo de prueba.

El cultivo de Lactobacillus plantarum ATCC 8014, se prepara en igual forma que el cultivo de Lactobacillus casei. Consultar método anterior.

- Inóculo.

La preparación del inóculo se realiza por un subcultivo - de Lactobacillus plantarum, en 10 ml de Bacto Micro-Inoculum - Broth. Acompañado de una incubación de 24 horas a una temperatura de 35 - 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, las células son centrifugadas en condiciones asépticas y el líquido sobrenadante es desechado. Resuspender las células de este cultivo en 10 ml de solución de NaCl al 0.9 % estéril, centrifugar y desechar el líquido sobrenadante, repetir este proceso 3 veces.

Las células son diluidas 1:100 con solución de NaCl al -- 0.9 %. Una gota de esta última suspensión es usada en la inocu- lación de cada uno de los tubos del análisis.

- Extracción de la muestra.

Como se ha mostrado, las características Fisicoquímicas - del ácido nicotínico nos permite el uso de una hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática para su extracción.

- Curva de Calibración.

La curva de calibración se prepara a partir de una serie-

de diluciones conteniendo concentraciones de ácido nicotínico- en intervalos de 0.06, 0.12, 0.18, 0.25, 0.31, 0.37 y 0.50 microgramos/ml. La concentración de la solución patrón requerida para la preparación de la curva es de 25 mcg/ml y la concentración de la solución tipo será de 0.25 mcg/ml. (Gráfica No. 5)

- Evaluación.

- 1.- Preparar una serie de tubos, conteniendo las diluciones especificadas para la curva de calibración, como se muestra en la Tabla No. 6 del apéndice.
- 2.- Para el problema, tomar 0.5 ml del extracto preparado de la muestra y trabajarlos en forma paralela a la curva de calibración.
- 3.- Adicionar a todos los tubos (incluyendo el problema), 5 ml de Bacto Niacin-Assay Medium B 322, estéril.
- 4.- Esterilizar en autoclave durante 10 minutos a 15 lb. de presión ó 121 °C.
- 5.- Agregar una gota de inóculo a cada tubo de la dilución 1:100, previamente preparada.
- 6.- Incubar de 16 - 18 horas a una temperatura de 35 - 37 °C.
- 7.- Terminado el tiempo de incubación, la turbidez de las soluciones se mide en un Espectrofotómetro a 536 nm contra blanco de reactivo.
- 8.- Los valores obtenidos en D.O. se grafican contra la concentración; la lectura de D.O. del problema se extrapola en -

la curva obtenida. (4),(5),(24),(55),(56),(58), (*).

Cálculos.

Concentración teórica de Acido Nicotínico en el alga Spirulina maxima: 107 mg/Kg de Spirulina seca. (*)

107 mg de ácido nicotínico en 1 Kg de Spirulina seca, ---
equivalen a 107 mg de ácido nicotínico en 10 Kg de Spiru-
lina fresca.

107 mg --- 10 000 gr.

X --- 5 gr.

$$X = \frac{107 \text{ mg} \times 5 \text{ gr}}{10\ 000 \text{ gr}} = 0.0535 \text{ mg}$$

En 5 gr. de Spirulina fresca tenemos una concentración --
teórica de 0.0535 mg. (53.5 mcg) de ácido nicotínico, --
contenido en un volumen de extracción de 100 ml.

53.5 mcg --- 100 ml

X --- 1 ml

$$X = \frac{53.5 \text{ mcg} \times 1 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0.53 \text{ mcg.}$$

En 1 ml de extracto tendremos 0.53 mcg de ácido nicotíni-
co.

Volumen de extracto a utilizar: 0.5 ml.

Concentración teórica en 0.5 ml de extracto es de 0.265 -

mcg de ácido nicotínico. (6), (*).

g) Importancia de la Determinación Química (Fluorimetría), de las Vitaminas.

Cuando una sustancia absorbe energía radiante ultravioleta o visible, sus electrones se excitan pasando a niveles energéticos más altos. Por regla general, los electrones regresan inmediatamente a su estado normal y la energía se desprende como calor y se disipa en el propio medio absorbente. Sin embargo, existen algunas sustancias en las cuales una porción de la energía absorbida se vuelve a emitir en forma de luz. Si esta emisión es rápida (por lo general 10^{-8} seg, aprox.), al fenómeno se le llama fluorescencia. Si el proceso tarda en producirse, la emisión constituye una fosforescencia, la luz emitida tiene menor energía y consecuentemente, es de mayor longitud de onda que la luz excitante. El retorno de los electrones al estado normal puede verificarse por etapas, cada una de las cuales representa una diferencia de energía perfectamente definida, esto es, cuantizada.

Sin embargo, las moléculas dan lugar a espectros de bandas, debido a las diversas transiciones vibratorias y rotatorias asociadas con la transición electrónica. Por consiguiente los espectros fluorescentes, al igual que los de absorción ---

consisten en bandas conectadas. De hecho, una gráfica de la intensidad de la fluorescencia en función de la longitud de onda suele ser una imagen reflejada de la curva de absorbancia de la misma especie, obtenida en condiciones comparables.

La intensidad de la luz fluorescente depende de varios factores. Para los propósitos analíticos basta con decir que, a concentraciones bajas (10^{-4} a 10^{-7} M), y dentro de límites estrechos, la intensidad de la fluorescencia es proporcional tanto a la intensidad de la luz excitante como a la concentración de la especie fluorescente. En muchos casos, la intensidad de la fluorescencia es afectada por la temperatura, el pH y la presencia de sustancias que aumentan su intensidad (activadores) o la disminuyen (agentes represores).

En las determinaciones fluorimétricas, la concentración de la especie se obtiene a partir de una curva de calibración, que es una gráfica de la intensidad de la luz fluorescente, en función de la concentración de la sustancia buscada. Las sustancias que ejercen un efecto represor sobre la fluorescencia se pueden determinar empleando una curva de calibración, que se obtiene adicionando cantidades conocidas de represor, a un volumen medido de una solución preparada con una sustancia fluorescente adecuada a una concentración definida.

Los métodos fluorimétricos son de gran valor en la determinación de cantidades muy reducidas de sustancias, para las

cuales los métodos fotométricos y otros carecen de suficiente sensibilidad o selectividad.

La alta sensibilidad de las determinaciones fluorimétricas, en comparación con las fotométricas, se debe al hecho de que en la fluorimetría se mide la intensidad de una señal pequeña, mientras que en la fotometría se mide una pequeña diferencia entre dos señales bastante considerables. Cuando se quiere determinar una sustancia no fluorescente, ésta se puede transformar a una especie que sí lo sea haciéndola reaccionar con un agente fluorescente apropiado. (62).

- Características e Importancia de la Vitamina B₁ (Tiamina).

La vitamina B₁ cristalizada es el clorhidrato de 2-metil-5 (cloruro de 4-metil-5-beta-hidroxietil-tiazol), metil-6 amino piridina (como se muestra en el figura), fue aislada por primera vez por Jansen y Donath.

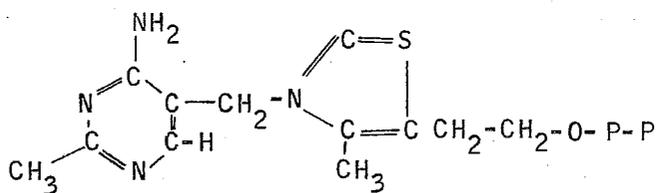
El vitamín se encuentra en prácticamente todos los tejidos vegetales y animales que se usan comúnmente como alimentos, pero esto en pequeñas cantidades.

La vitamina está combinada con 2 moléculas de ácido fosfórico, formando un complejo difosfato (pirofosfato de Tiamina) que constituye el más importante agente catalítico de oxidación: interviene en los sistemas de α -cetoácido descarboxila-

sa, α - cetoácido oxidada, transcetolasa y fosfocetolasa.

Entre las fuentes más abundantes se encuentran los granos de cereales (germen de trigo, soja), leche, hígado, el corazón, el riñón y la carne magra de cerdo. Por calentamiento en solución neutra ó alcalina y en contacto con el aire, se separan - las 2 mitades de la molécula y desaparece la actividad vitamínica, puesto que el vitamín es hidrosoluble y hasta cierto punto termolábil.

La deficiencia en Tiamina afecta predominantemente al sistema nervioso periférico, al aparato digestivo y al sistema -- cardiovascular. Se ha demostrado que la Tiamina es de valor en el tratamiento del beriberi, en las neuritis alcohólicas y en las neuritis del embarazo ó de la pelagra. (18),(31),(40),(57)



Tiamina
(C₁₂H₁₇N₄OS)

- Procedimientos Analíticos.

El proceso está basado en la oxidación de la Tiamina o --
Tiocromo, el cual fluoresce cuando se ilumina con luz ultravio-
leta, bajo condiciones estándares y en ausencia de otras sus-
tancias fluorescentes. La fluorescencia será proporcional al -
Tiocromo presente.

Material.

Tubos de ensaye de 16 x 150 mm

Pipetas de 1 ml

Pipetas de 5 ml

Pipetas de 10 ml

Matraz aforado de 100 ml

Matraz aforado de 1000 ml

Embudos de Separación

Balanza analítica

Autoclave

Baño María

Refrigerador

Centrífuga

Estufa de cultivo

Fluorometro

Papel pH

Papel aluminio

Papel de china negro

Papel filtro Whatman No. 40

Reactivos.

Solución de ferrocianuro de potasio al 1 %

Solución de hidróxido de sodio al 15 %

Solución de ácido sulfúrico 0.1 N.

Solución de ácido clorhídrico 0.1 N.

Solución alcohólica acidificada.

Se prepara una solución alcohólica 1:5 de etanol y se ajusta el pH a 4 con ácido clorhídrico 0.1 N.

Solución de cloruro de potasio al 25 %.

Reactivo oxidante.

Mezclar 2 ml de solución de ferrocianuro de potasio al 1 % - con 48 ml de solución de hidróxido de sodio al 15 %; usar en un lapso no mayor de 4 horas.

Solución Stock de sulfato de Quinina.

Disolver 10 mg de sulfato de Quinina en 1000 ml de ácido sulfúrico 0.1 N. Conservar esta solución protegida de la luz y en el refrigerador.

Solución estandar de sulfato de Quinina.

Diluir 1 volumen de solución Stock de sulfato de Quinina en 39 volúmenes de ácido sulfúrico 0.1 N.

NOTA: Esta solución fluoresce aproximadamente en la misma se-

rie que el tiocromo obtenido para 1 mcg de clorhídrido de --
Tiamina, y se usa para corregir el Fotófluorometro en inter-
valos frecuentes, observando la variación en sensibilidad en
tre una lectura y otra.

Solución patrón de clorhídrido de Tiamina.

Pesar 20 mg de clorhídrido de Tiamina U.S.P.; previamente se
car a 105 °C por 2 horas. Disolver lo pesado en 300 ml de so-
lución alcohólica (1:5) y ajustar el pH de la solución a 4.0
con ácido clorhídrico 0.1 N, aforar a 1000 ml con solución -
alcohólica (1:5). La concentración de la solución patrón se-
rá de 20 mcg/ml.

Solución tipo.

Tomar 1 ml de la solución patrón y llevarlo a 100 ml con so-
lución alcohólica acidificada. La concentración será de .2 -
mcg/ml.

Papaína, actividad proteolítica 1:350

Diastasa, formadora de maltosa con actividad de 1:250

L (-) Cistina clorhídrica.

Alcohol Isobutilico (R.A.)

Solución amortiguadora de Acetato de sodio estandarizada a -
un pH de 4.6.

Tolueno.

Sulfato de sodio anhidro.

- Extracción de la muestra.

Se pesan 5 gr de Spirulina fresca y se homogenizan con -- 75 ml de ácido clorhídrico 0.1 N, en un matraz aforado de --- 100 ml. La suspensión se somete a calor en un autoclave a --- 15 lb de presión ó 120 °C durante 20-30 minutos (el tiempo de calentamiento se ajusta de acuerdo a la finura de la muestra y a la rapidez con que sea liberada la vitamina), se deja enfriar a temperatura ambiente y se adicionan 100 mg de L (-) Cistina clorhídrica; ajustar el pH de la solución a 4.0 con solución amortiguadora de acetato de sodio.

Para el rompimiento de los ésteres del ácido fosfórico -- con la vitamina B₁, el extracto se incuba a 50 °C aproximada-- mente 10 minutos; se enfria a temperatura ambiente y se adicionan 50 mg de diastasa y 50 mg de papaína; al final se agregan-- 0.5 ml de Tolueno. Se agita el matraz vigorosamente y se coloca en una estufa de cultivos a 37 °C durante 5 horas como máximo. Terminado el tiempo de incubación se afora el matraz a la marca con ácido clorhídrico 0.1 N. Se procede a clarificar la solución por filtración o centrifugación.

- Preparación de la muestra.

A 2 ml del filtrado de la extracción, se le adicionan --- 3 ml de KCl al 25 % acidificado.

- Curva de calibración.

Se prepara una curva de calibración, para lo cual se elaboran una serie de diluciones conteniendo concentraciones de -

Tiamina en intervalos de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mcg/ml.

La concentración de la solución patrón requerida para la preparación de la curva es de 20 mcg/ml y la concentración de la solución tipo será de 0.2 mcg/ml. (Gráfica No. 6 apéndice)

- Evaluación.

- 1.- Preparar una serie de embudos, conteniendo las diluciones-especificadas para la curva de calibración, como se muestra en la Tabla No. 7 del apéndice.
- 2.- Dentro de cada uno de los embudos de separación, adicionar rápidamente (dentro de 1 ó 2 segundos) 3 ml de la mezcla - del reactivo oxidante, en los siguientes 30 segundos adicionar 15 ml de Alcohol Isobutilico libre de impurezas --- fluorescentes, mezclar vigorosamente por 90 segundos.
- 3.- Preparar un Blanco, substituyendo el reactivo oxidante por un volumen igual de hidróxido de sodio al 15 % (3 ml), proceder en la misma forma antes descrita.
- 4.- Para el problema se toman los 5 ml obtenidos en la preparación de la muestra y se trabajan en la misma forma.
- 5.- A todas las muestras se les permite la separación de las 2 fases. Los estratos acuosos se quitan rápidamente y los estratos de Isobutanol se filtran a través de una pisca de - sulfato de sodio anhidro.
- 6.- Se mide la Fluorescencia de los estratos de Isobutanol en- un Fluorómetro fotoeléctrico a una longitud de onda de ---

436 nm.

7.- Los valores obtenidos en % de Fluorescencia, se grafican -
contra la concentración; la lectura en % de Fluorescencia-
del problema se extrapola en la curva obtenida.

NOTA: Siendo que el Tiocromo se descompone gradualmente --
por la luz ultravioleta, la solución no debe permanecer en
el emisor del Fotofluorómetro más de 15 segundos. La intenu
sidad de la radiación primaria puede mantenerse al mínimo.

Por otra parte, si la vitamina B₁ está presente como la
sal de la Tiamina libre, y la interferencia es debida solau
mente a la presencia de otras sustancias Fluorescentes, -
la substracción de esta fluorescencia extraña puede hacer-
se con el blanco. (4),(48),(59),(*).

- Cálculos.

Concentración teórica de Vitamina B₁ en el alga

Spirulina maxima: 39 mg/Kg de Spirulina seca. (*)

39 mg de Tiamina en 1 Kg de Spirulina seca, equivalen a

39 mg de Tiamina en 10 Kg de Spirulina fresca.

Cantidad de muestra empleada: 5 gr de Spirulina fresca.

39 mg --- 10 000 gr

X --- 5 gr

$$X = \frac{39 \text{ mg} \times 5 \text{ gr}}{10\ 000 \text{ gr}} = .019 \text{ mg}$$

En 5 gr de Spirulina fresca tenemos una concentración teórica de 0.019 mg (19 mcg) de vitamina B₁, contenidos en un volumen de 100 ml.

$$\begin{array}{l} 19 \text{ mcg.} \text{ --- } 100 \text{ ml} \\ X \text{ --- } 2 \text{ ml} \end{array} \quad X = \frac{19 \text{ mcg} \times 2 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0.38 \text{ mcg.}$$

En 2 ml de extracto tendremos 0.38 mcg de Tiamina.

Volumen de extracto a utilizar, 2 ml.

Concentración teórica en 2 ml de extracto es de 0.38 mcg. - de Tiamina. (6), (*)

h) Importancia y Evaluación de la Irradiación.

Para conocer el valor y los efectos de las irradiaciones sobre las células, deben medirse las dosis aplicadas. La gravedad de las lesiones por irradiación dependen de la dosis. Existen dos tipos de dosis de irradiación; una es la dosis de exposición y la otra es la dosis absorbida.

La dosis de exposición corresponde a la cantidad de irradiación a la cual se expusieron las células. Esta dosis de exposición, depende fundamentalmente de las propiedades de la fuente y de la distancia entre ésta y la substancia viva. Pero sólo produce efecto biológico sobre las células la energía equivalente a la dosis absorbida. Esta dosis absorbida depende

de dos factores; el primero es la cantidad de irradiación y el otro está relacionado con las propiedades físicas del sistema celular. (12)

- Fundamento de la determinación de la irradiación.

Se conoce que entre los 280 y 400 nm. los espectros de absorción de los pigmentos accesorios, se asemejan a los espectros de absorción de proteínas y ácidos nucleicos. A partir de los 320 nm los espectros de absorción de los pigmentos accesorios se vuelven medibles y dejan de confundirse con los de proteínas y ácidos nucleicos.

En el U.V-Alto el rendimiento de la fotosíntesis de las algas disminuye bruscamente alrededor de los 350 nm, volviéndose nula por debajo de los 300 nm. Por otra parte dicho rendimiento el U.V-Próximo es prácticamente constante o varía ligeramente entre los 350-400 nm.

Por lo tanto, a los pigmentos accesorios se les atribuye la máxima captación de energía luminosa en el rango del U.V-P.

Por lo anterior, se escogió el rango de los 250-450 nm, con un máximo de 400 nm (práctico); para llevar a cabo la realización de nuestro experimento.

Se determinó prácticamente la longitud de onda emitida -- por la lámpara, utilizándose un aparato Monocromador, tipo Cernie Turne, digital photometer tektronix, detector Radiometric probe J 6502. Las características de la lámpara fueron: G.E. -

15 W BLB, Black Light. Se obtuvo un pico de emisión máximo de 400 nm (apéndice Tabla No. 8).

- Evaluación y Diseño del Experimento.

Para conocer la dosis de absorción llevada a cabo por el sistema celular, se midió la intensidad de luz emitida por la lámpara:

1.- Lectura directa	0.424 MW / cm ² x 1000
2.- Lectura a través de la pecera	0.421 MW / cm ² x 1000
3.- Lectura a través de la pecera con medio de cultivo	0.170 MW / cm ² x 1000

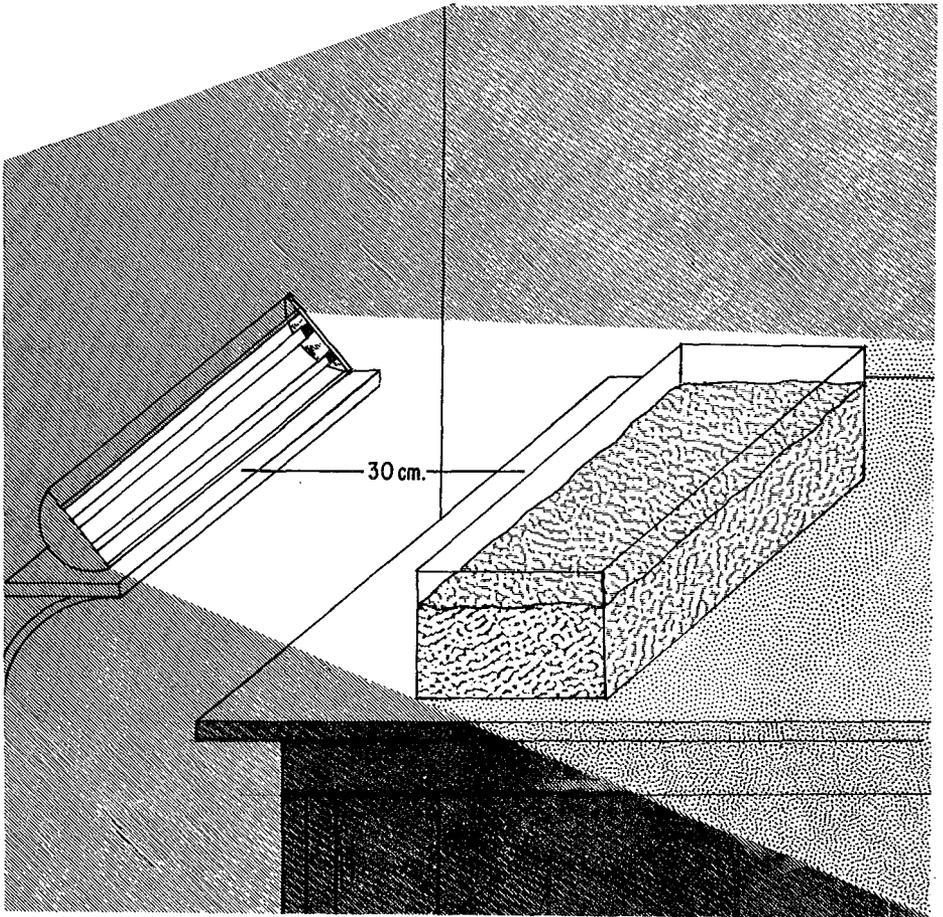
La distancia a la cual se irradió, se determinó tomando en cuenta lo siguiente: la intensidad de la irradiación varía inversamente proporcional al cuadrado de la distancia.

Condiciones para llevar a cabo la irradiación.-

Volumen	60 litros
Concentración	aprox. 822 ppm
pH	10 - 11
Temperatura	25 - 28 °C
Tiempo de agitación	Fase oscura: 30 min c/6 hrs.

	Fase luminosa: 30 min. c/6 hrs.
Distancia entre el medio y la fuente luminosa	30 cm.
Tiempo de irradiación:	12 Hrs. contínuas p/fase luminosa.
durante 3 días	12 hrs. contínuas p/fase <u>obscura</u> .

Diseño del modelo experimental para efectuar la irradiación de la solución algal.



Se llevo a cabo la irradiación durante tres días en obscuridad.

VI RESULTADOS.

Nombre	Determinación	Referencia	S. fresca conc.inicial	S.Irradiada conc. final	Variación %
Ficocianina	Extracción con solución acuosa de NaCl al 4 %	-	0.0034g/lit	0.0060g/lit	100%
Ficoeritrina	Extracción con solución acuosa de NaCl al 4 %	-	0.0059g/lit	0.012 g/lit	100%
Caroteno	Extracción con éter de petróleo.	1.83g/Kg	1.80 g/Kg	2.00 g/Kg	2.4%
Xantofilas.	Extracción con metanol.	1.61g/Kg	1.13 g/Kg	1.16 g/Kg	2.6%

Nombre	Determinación	Referencia	S. fresca conc. inicial	S. Iradiada conc. final	Variación %
Cloro- fila. Total	Extracción con acetona al 80.0 %	-	0.4865mcg/ml	0.6683mcg/ml	37.38%
Cloro- fila a extrac to total	Extracción con acetona al 80.0 %	-	0.2693mcg/ml	0.2848mcg/ml	5.74%
Cloro- fila b extrac to total	Extracción con acetona al 80.0 %	-	0.2171mcg/ml	0.3835mcg/ml	76.65%
Cloro- fila. suspension algal.	Extracción con acetona al 80.0 %	-	0.1000mcg/ml	0.1225mcg/ml	22.50%

Nombre	Determinación	Referencia	S. fresca Conc. inicial	S. Irradiada Conc. final	Variación
Proteínas	Método de Kjeldahl	68.0%	57.93%	81.25%	40.25%
Vitamina B ₂ Riboflavina	Método microbiológico -- Lactobacillus casei ATCC -- 7469	0.200 mcg/ ml de vitamina	0.182 mcg/ ml de vitamina	0.208 mcg/ ml de vitamina	14.20%
Vitamina B ₁₂ Cianocobalina	Método microbiológico -- Lactobacillus leichmanni ATCC 7830	0.050 mcg/ ml de vitamina	0.142 mcg/ ml de vitamina	0.174 mcg/ ml de vitamina	22.50%
Acido - Nicotínico	Método microbiológico - Lactobacillus plantarum ATCC 8014	0.530 mcg/ ml de vitamina	0.338 mcg/ ml de vitamina	0.376 mcg/ ml de vitamina	11.20%
Vitamina B ₁ Tiamina	Método Fluorométrico Determinación química	0.380 mcg/ ml de vitamina	0.314 mcg/ ml de vitamina	0.404 mcg/ ml de vitamina	28.60%

Extracción	Vitamina B ₂ Riboflavina	Vitamina B ₁₂ Cianocobalamina	Acido Nicotinico	Vitamina B ₁ Tiamina
Hidrólisis ácida I	0.071 D.O 0.202 mcg	0.660 D.O 0.136 mcg	0.070 D.O 0.242 mcg	28.00 %F 0.194 mcg
Hidrólisis ácida II	0.068 D.O 0.193 mcg	0.610 D.O 0.124 mcg	0.064 D.O 0.220 mcg	25.00 %F 0.162 mcg
Hidrólisis Enzimática III	0.072 D.O 0.204 mcg	0.880 D.O 0.174 mcg*	0.108 D.O 0.376 mcg*	48.00 %F 0.340 mcg
Hidrólisis Enzimática IV	0.074 D.O 0.208 mcg*	0.870 D.O 0.174 mcg	0.105 D.O 0.368 mcg	48.53 %F 0.360 mcg
Hidrólisis Mixta (áci da-enzimá tica)	0.066 D.O 0.188 mcg	0.810 D.O 0.164 mcg	0.089 D.O 0.310 mcg	59.00 %F* 0.404 mcg

* DATOS SELECCIONADOS PARA INTEGRAR LA TABLA DE RESULTADOS.

Aparato.: Perkin Elmer, Fluorescence MPF-3L, Spectrophotometer.

VII DISCUSION

Para llevar a cabo este experimento, las pruebas seguidas para la evaluación de estos componentes en los vegetales superiores, no son prácticamente aplicables en este tipo de algas.

Si la adaptación del cultivo, se efectúa en el laboratorio con los requisitos necesarios para mantenerlo viable, es factible de adaptarse.

La hipótesis sobre el hecho de que los pigmentos accesorios atrapan y transfieren la energía a la clorofila en este rango del espectro (250 - 440 nm), fué verificada por medio de este experimento al observarse una elevación en la concentración de ellos y al mismo tiempo el metabolismo se acelera en virtud de que los fotones aplicados son más eficaces, debido a la longitud de onda en que actúan.

Durante la determinación de proteínas se observó un incremento del 40.25 %, lo cual indica que la síntesis de proteínas se acelera durante la irradiación del cultivo. La reproducción del alga es relativamente rápida y además, las condiciones para su cultivo son propias para evitar la contaminación, ya que para que éste se lleve a cabo requiere de un pH elevado, aguas salobres y condiciones ambientales específicas.

Con respecto al efecto que causaría la exposición de la suspensión algal a la luz ultravioleta en las vitaminas del

grupo B y ácido nicotínico, era de esperarse que el vitamin sufriera una desactivación causando una degradación de dichos componentes; por el contrario, se observó un incremento de estas, - lo cual nos indica que en la longitud de onda utilizada se activó el metabolismo en general.

Las características hidrosolubles de las vitaminas, nos -- llevaron a utilizar un solo método de extracción para la cuantificación de dichas vitaminas. Para lo cual se experimento con - tres tipos de hidrólisis (ácida, enzimática y ácida - enzimática), la hidrólisis enzimática es la que nos muestra mejores resultados en la extracción de las vitaminas B₂, B₁₂ y ácido nico tínico, la hidrólisis ácida nos presenta una concentración me-- nor de la vitamina extraída, por lo cual no resulta adecuada pa ra tal proceso, la hidrólisis mixta (ácida - enzimática), reco mendada por la farmacopea para la extracción de vitamina B₁, - es aceptable para llevarla a cabo en Spirulina maxima; con res pecto a las otras vitaminas, tal referencia nos hace obtener -- concentraciones aceptables de ellas. Sin embargo, con relación a la hidrólisis enzimática, los resultados obtenidos para esta última son mejores.

En comparación con otros microorganismos el alga Spirulina maxima resiste tal rango de irradiación por sus características estructurales, no sucediendo esto en otros organismos.

Las necesidades para efectuar este proceso son específicas

debido a que la luz ultravioleta inhibe, activa ó modifica la estructura celular; por ésta razón se determinó el rango de irradiación, previniendo así, tales fenómenos.

VIII CONCLUSIONES

La adaptación del cultivo del alga Spirulina maxima bajo condiciones de laboratorio, se logró siguiendo las recomendaciones establecidas en procesos industriales para su cultivo, comprobándose que se puede mantener en condiciones óptimas durante períodos considerables, lo cual se ratifica por medio de los resultados obtenidos.

Con relación a los pigmentos de origen proteico obtuvimos un incremento del 100 %, comprobándose así, su función de captadores de energía luminosa en el rango utilizado, después de observar el incremento tan grande que sufrieron los pigmentos de origen proteico, podemos concluir que estos pueden substituir a pigmentos de origen mineral, puesto que las ficocianinas, pigmentos de color azul, los cuales poseen un color primario siendo además muy estables, se pueden aprovechar industrialmente ya que la cantidad obtenida es considerable.

El contenido proteico del alga resulta muy elevado en relación con el de otros microorganismos, lo cual la hace aprovechable como alimento natural por su fácil digestión y máxima asimilación, dichas cualidades hacen del alga un alimento de bajo costo y alto valor nutritivo, lo que la hace objeto de mayor consumo.

Correlacionando los métodos de extracción de las vitaminas

por los ensayos de hidrólisis ácida y enzimática se resolvió -- que una hidrólisis enzimática proporciona mejores resultados en la extracción de dichas substancias; pudiendose aplicar un solo tipo de extracción para todas las determinaciones de vitaminas. Haciendose notar que para efectuar la extracción de vitamina B₁ se recomienda utilizar la hidrólisis mixta, pues se obtienen mejores resultados.

Debido a la resistencia de la estructura celular del alga y a su gran poder de adaptación con respecto a fenómenos físicos y químicos, no sufrió ningún cambio ó mutación en su organismo durante el período de irradiación.

Desde el punto de vista económico, es mejor la irradiación natural del espectro solar; aunque esto solo se realice en determinadas regiones (Tchad, Africa; Lago de Texcoco, México), y en cierta época del año (en México se realiza anualmente), debido a los requerimientos naturales del cultivo. El cultivo bajo la influencia de luz artificial resulta efectivo aunque un tanto costoso relativamente, ya que el incremento en su producción industrial compensaría el costo de su inversión. Además, se excluye totalmente la posibilidad de poderse adaptar éste -- cultivo a otros tipos de aguas a diferentes estratos con respecto al nivel del mar.

IX APENDICE

Fig. No. 1 Estructura de las Ficobiliproteínas

Fig. No. 2 Estructura de la Clorofila.

Tabla A. Cálculos para RNA y DNA en porcentajes.

Tabla No. 1 Excitación de la energía transferida entre los pigmentos de células algales.

Tabla No. 2 Composición de los aminoácidos de C Ficocianina y sus sub-unidades, de algas azul-verdes filamentosas.

Tabla No. 3 Requerimientos diarios recomendados en la dieta.

Tabla No. 4 Vitamina B₂ Riboflavina.

Tabla No. 5 Vitamina B₁₂ Cianocobalamina.

Tabla No. 6 Vitamín ácido nicotínico.

Tabla No. 7 Vitamina B₁ Tiamina.

Cuadro No. 1 Cuadro sinóptico de métodos microbiológicos.

Gráfica No. 1 Ficocianina.

Gráfica No. 2 Ficoeritrina.

Gráfica No. 3 Vitamina B₂ Riboflavina.

Gráfica No. 4 Vitamina B₁₂ Cianocobalamina.

Gráfica No. 5 Vitamín ácido nicotínico.

Gráfica No. 6 Vitamina B₁ Tiamina.

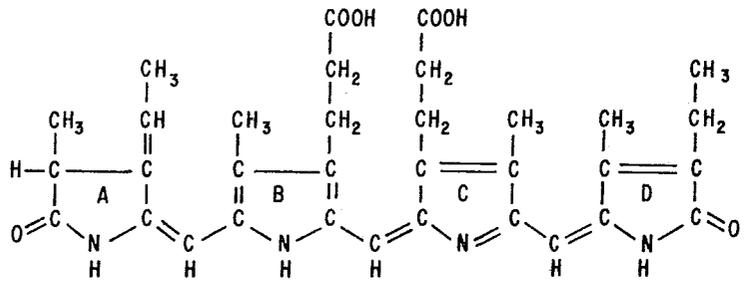
Gráfica No. 6 A, B, C. Gráficas de la determinación — Fluorométrica de la vitamina B₁ Tiamina.

Gráfica No. 7 Determinación gráfica de la longitud de onda - -
emitida por la lámpara. 0.05

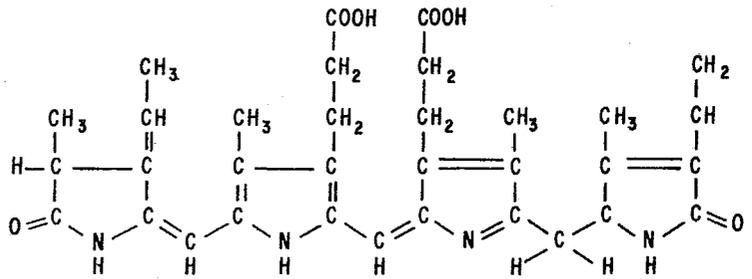
Gráfica No. 8 Determinación gráfica de la longitud de onda - -
emitida por la lámpara. 0.043

Fig. No. 1

ESTRUCTURA DE LAS FICOBILIPROTEINAS

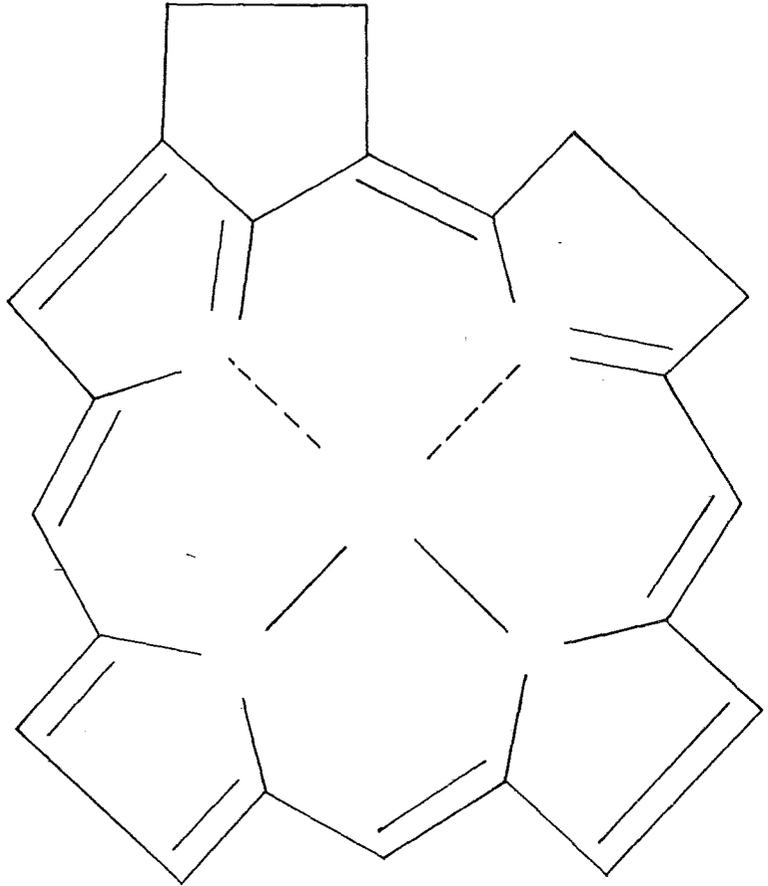


FICOCIANOBILINA



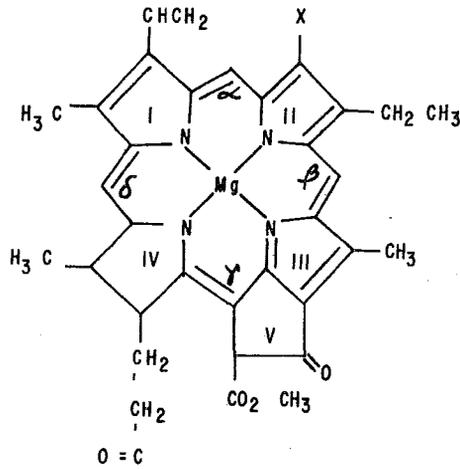
FICOERITROBILINA

Fig. No. 2



CLOROFILA

Fig. No. 2 Bis



Estructura de las clorofilas. En la clorofila a, X = -CH₃; en la clorofila b, X = -CHO. obsérvese que existe un anillo de ciclopentanona condensado (V), además de los 4 anillos pirrólicos. En la bacterioclorofila el anillo pirrólico II está reducido. Cuando el enlace éster con el fitol se hidroliza, se produce un clorofilido.

Cadena de fitol.

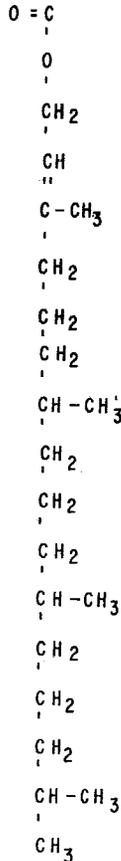


Tabla A.

	URACILO	CITOSINA	GUANINA	ADENINA	PURINA- PIRIMIDINA
RNA de Referencia	32.8-0.2	12.2-0.3	27.1-0.5	27.9-0.4	1.23-0.04
RNA de <u>S. platensis</u>	16.3-0.2	12.2-0.2	42.3-0.7	29.2-0.7	2.5 -0.1
RNA de <u>S. maxima</u>	32.6-0.6	12.9-0.8	42.4-1.1	37.0-0.4	2.21-0.1
	ADENINA	TIMINA	GUANINA	CITOSINA	AT/GC
DNA de Referencia	28.4-0.8	31.4-5	20.2-0.7	20.0-0.06	1.48-0.02
DNA de <u>S. platensis</u>	18.9-0.3	--	31.1-0.3	--	0.61-0.02
DNA de <u>S. maxima</u>	15.0-0.8	--	35.0-0.8	--	0.43-0.03

Tabla No. 1

EXCITACION DE LA ENERGIA TRANSFERIDA ENTRE LOS PIGMENTOS DE CELULAS ALGALES*

		Tiempo de transferencia T \pm 0.2 mms.	Eficiencia de la transferencia %.
<u>Porphyridium cruentum</u>			
Ficoeritrina	Ficocianina	0.3	96 \pm 3
Ficocianina	Clorofila a	0.5	78 \pm 8
<u>Anacystis nidulans</u>			
Ficocianina	Clorofila a	0.3	86 \pm 8

* El alga fúe adaptada a un estado de oscuridad durante el experimento (Tomita y Rabinowitch, 1962). (37)

Tabla No. 2

COMPOSICION DE LOS AMINOACIDOS DE C FICOCIANINA Y SUS SUBUNIDADES, DE ALGAS AZUL-VERDES FILAMENTOSAS.*

Aminoácidos	Spirulina maxima		
Lisina	12	9	3
Histidina	16	8	8
Acido aspártico	30	18	13
Treonina	17	9	7
Serina	24	14	11
Acido glutámico	27	17	10
Prolina	11	6	5
Glicina	24	17	10
Alanina	48	25	22
Valina	17	8	9
Metionina	9	4	4
Isoleucina	18	11	6
Leucina	20	14	11
Tirosina	15	11	4
Fenilalanina	8	4	3
Triptófano	1	1	0

* Análisis en proteína preparada de material original colectada del Lago de Texcoco, México A.N. Glazer, resultados no publicados. (37)

Tabla No. 3

REQUERIMIENTOS DIARIOS RECOMENDADOS EN LA DIETA

	Edad en Años	Proteínas /g	VITAMINAS HIDROSOLUBLES				
			Niacina eq ⁴ a 1 mg	Riboflavina /mg.	Tiamina /mg.	Vitamina B ₆ /mg.	Vitamina B ₁₂ -mcg
Lactantes	0 - 1 años	Kg x 2.25 Kg x 1.85	5 - 8	0.4 - 0.6	0.2 - 0.5	0.2 - 0.4	1.0 - 2.0
Niños	1 -10 años	25 - 40	8 - 15	0.6 - 1.2	0.6 - 1.1	0.5 - 1.2	2 - 5
Hombres	10 -55 años	45 - 65	17 - 20	1.3 - 1.7	1.3 - 1.5	1.4 - 2.0	5 - 6
Mujeres	10 -55 años	50 - 55	13 - 16	1.3 - 1.5	1.0 - 1.2	1.4 - 2.0	5 - 6
Embarazo	-	65 -	15	1.8	+ - 0.1	2.5	8
Contenido de la S. máxima	-	68 - 70%	107 mg/Kg de S. seca	40 mg/Kg de S. seca	39 mg/Kg de S. seca	3mg/Kg de S. seca	2 mg/Kg de S. seca

eq⁴ - Los equivalentes de Niacina incluyen las fuentes alimenticias del Vitamina B₃, más 1 mg por cada 60 mg de Triptofano del alimento. (31).

Tabla No. 4

B₂ R I B O F L A V I N A

Tubos	Solución Tipo	H ₂ O	Medio de Cultivo	Autoclave	Inóculo	Incubación	Lectura	Concentración	1a. D.O	2a. D.O
B	0.0	5ml	5 ml	10 Minutos a 15 lb de Presión ó 121	Una gota de una Dil. 1:20 en Sol. NaCl estéril	De 18-24 horas a 35-37 °C	Leer a 536 nm	Blanco	0.010	0.074
1	0.25	4.75						0.025		
2	0.50	4.50						0.050		
3	0.75	4.25						0.075		
4	1.00	4.00						0.100		
5	1.50	3.50						0.150		
6	2.00	3.00						0.200		
7	3.00	2.00						0.300		
P ₁	1 ml de Ext.	4 ml	X	0.064	0.074					

Tabla No. 5

B₁₂

C I A N O C O B A L A M I N A

Tubos	Solución tipo	H ₂ O	Medio de cultivo	Autoclave	Inóculo	Incubación	Lectura	Concentración mcg.	1a. D.O	2a. D.O
B	0.0	5ml	5 ml	5 Minutos a 15 libras de P o 121 °C	Una gota de Inóculo de una dilución 1:100 en medio B ₁₂ assay USP 457 Difco	De 20-24 horas a 35-37 °C	Leer a 546 nm	Blanco		
1	0.25	4.75						0.0125	0.07	
2	0.50	4.50						0.0250	0.10	
3	0.75	4.25						0.0375	0.18	
4	1.00	4.00						0.0500	0.26	
5	1.50	3.50						0.0750	0.35	
6	2.00	3.00						0.1000	0.48	
7	2.50	2.50						0.1250	0.62	
8	3.00	2.00						0.1500	0.76	
9	4.00	1.00						0.2000	0.98	
P	5 ml Ext.	--					X	0.71	0.88	

Tabla No. 6

ACIDO NICOTINICO

Tubos	Solución tipo	H ₂ O	Medio de cultivo	Autoclave	Inóculo	Incubación	Lectura	Concentración mcg.	1a. D.O	2a. D.O
B	0.0	5ml	5 ml	10 Minutos a 15 libras de P o 121 °C	Una gota de una dilución 1:100 en NaCl estéril	De 16-18 horas a 35-37 °C	Leer a 536 nm	Blanco		
1	0.25	4.75						0.0625	0.015	
2	0.50	4.50						0.1250	0.036	
3	0.75	4.25						0.1875	0.047	
4	1.00	4.00						0.2500	0.066	
5	1.25	3.75						0.3120	0.093	
6	1.50	3.50						0.3750	0.107	
7	2.00	3.00						0.5000	0.162	
P	0.5ml Ext.	4.50						X	0.097	0.108

Tabla. No 7.

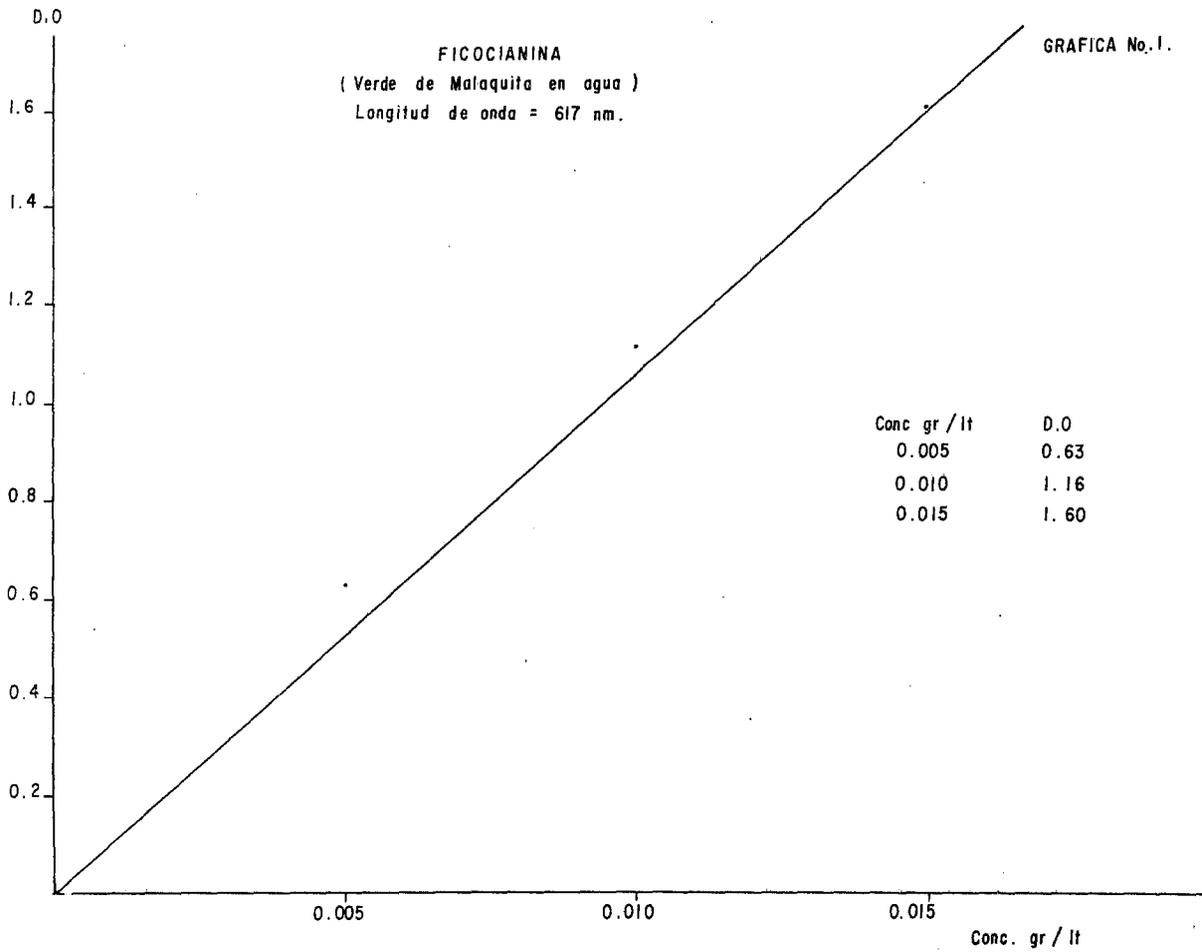
B₁ T I A M I N A

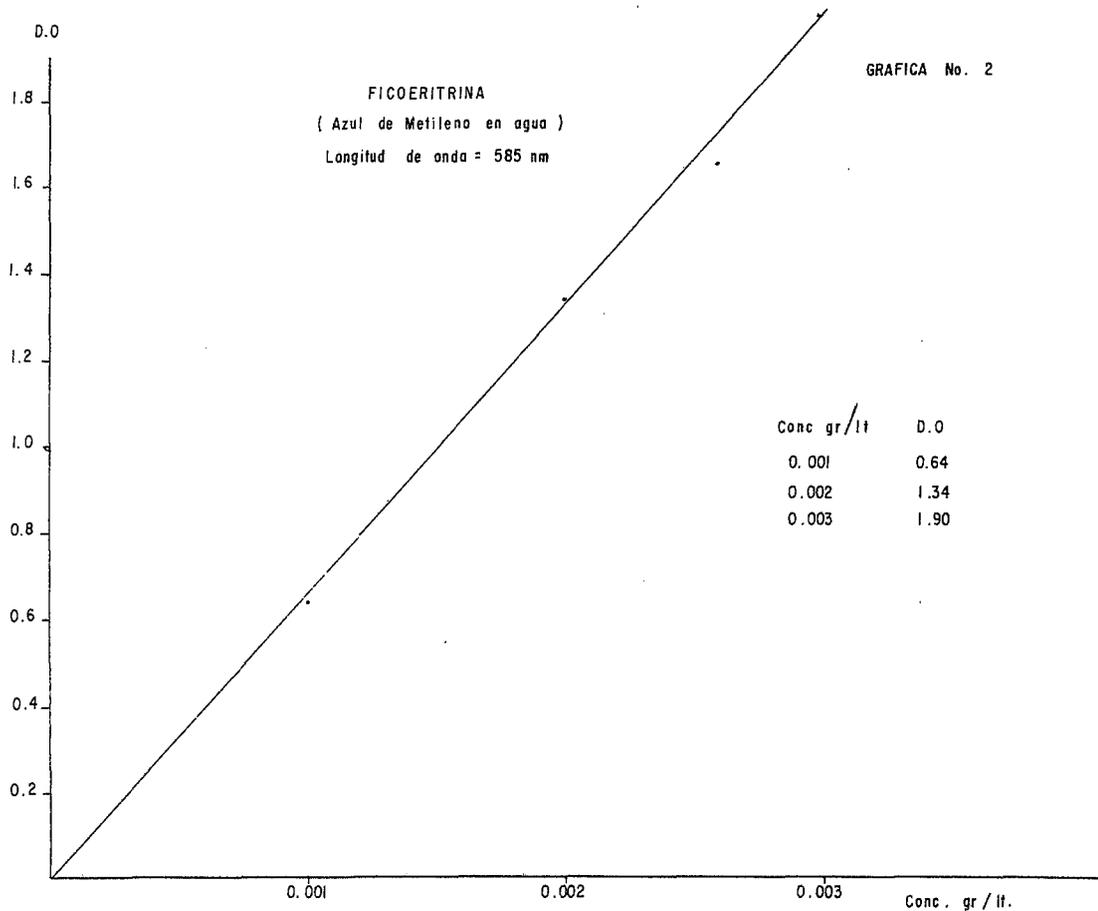
Embudos	Solución Alcohólica Acidificada	en ml Solución Tipo	Extracto	NaOH 15%	Reactivo Oxidante	Alcohol Isobutílico	Agitar 90 seg	Separación de fases	Eliminación sol. acuosa	Lectura iso-butanol	Lectura % Fluorescencia	Concentración/mcg.
B	5.0 ml	-	-	3 ml	-	15 ml					9	blanco
1	4.5 ml	0.5	-	-	3 ml	15 ml					20	0.100
2	4.0 ml	1.0	-	-	3 ml	15 ml					30	0.200
3	3.5 ml	1.5	-	-	3 ml	15 ml	Positivo	Positivo	Positivo	436	43	0.300
4	3.0 ml	2.0	-	-	3 ml	15 ml				nm	61	0.400
5	2.5 ml	2.5	-	-	3 ml	15 ml					81	0.500
P ₁	-	-	5 ml	-	3 ml	15 ml					59	0.314

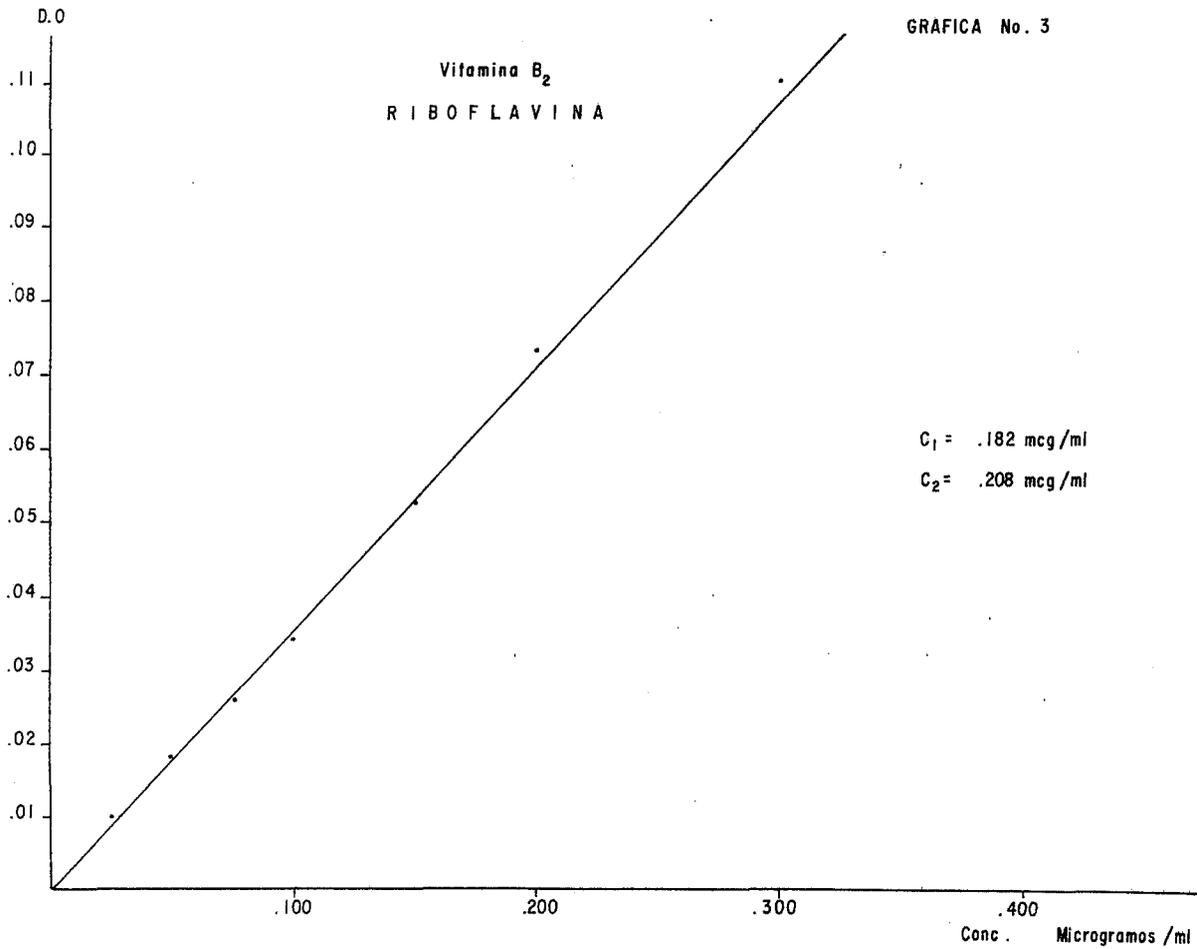
Cuadro No. 1

CUADRO SINOPTICO DE METODOS MICROBIOLÓGICOS

Vitaminas	Microorganismo de Prueba			Caldo de prueba	Solución Standar	Extracción	Concentraciones de Prueba	Esterilización	Incubación
	Nombre	Almacena miento	Inóculo						
B ₂ Riboflavina	Lactobacillus casei ATCC 7469	Micro-assay cultivo agar B 319 Difco	24 hr a 35-37°C en Bacto Micro-inóculo cdo.	Riboflavina assay-medio B 325 - Difco	0.1 g de Riboflavina en 1 lt de agua caliente	Acida ó Enzimática	De 0.025 a 0.3 mcg/ml de Riboflavina	Autoclave por 10 min. a 15 lb.	18-24 hr a 35-37°C
B ₁₂ Cianocobalamina	Lactobacillus leichmannii ATCC 7830	Micro-assay cultivo agar B 319 Difco	24 hr a 35-37°C en Bacto Micro-inóculo cdo.	B12 assay-medio USP B 457 Difco	0.2 g de Cianocobalamina en 1000 ml de agua	Acida ó Enzimática	De 0.0125 a 0.2 mcg/ml de Cianocobalamina	Autoclave por 5 min. a 15 lb.	20-24 hr a 35-37°C
Acido Nicotínico	Lactobacillus plantarum ATCC 8014	Micro-assay cultivo agar B 319 Difco	24 hr a 35-37°C en Bacto Micro-inóculo cdo.	Niacin assay medio B 322 Difco	0,025 g de ácido Nicotínico en 1000 ml de agua	Acida ó Enzimática	De 0.0625 a 0.5 mcg/ml de ácido Nicotínico	Autoclave por 10 min. a 15 lb.	16-18 hr a 35-37°C

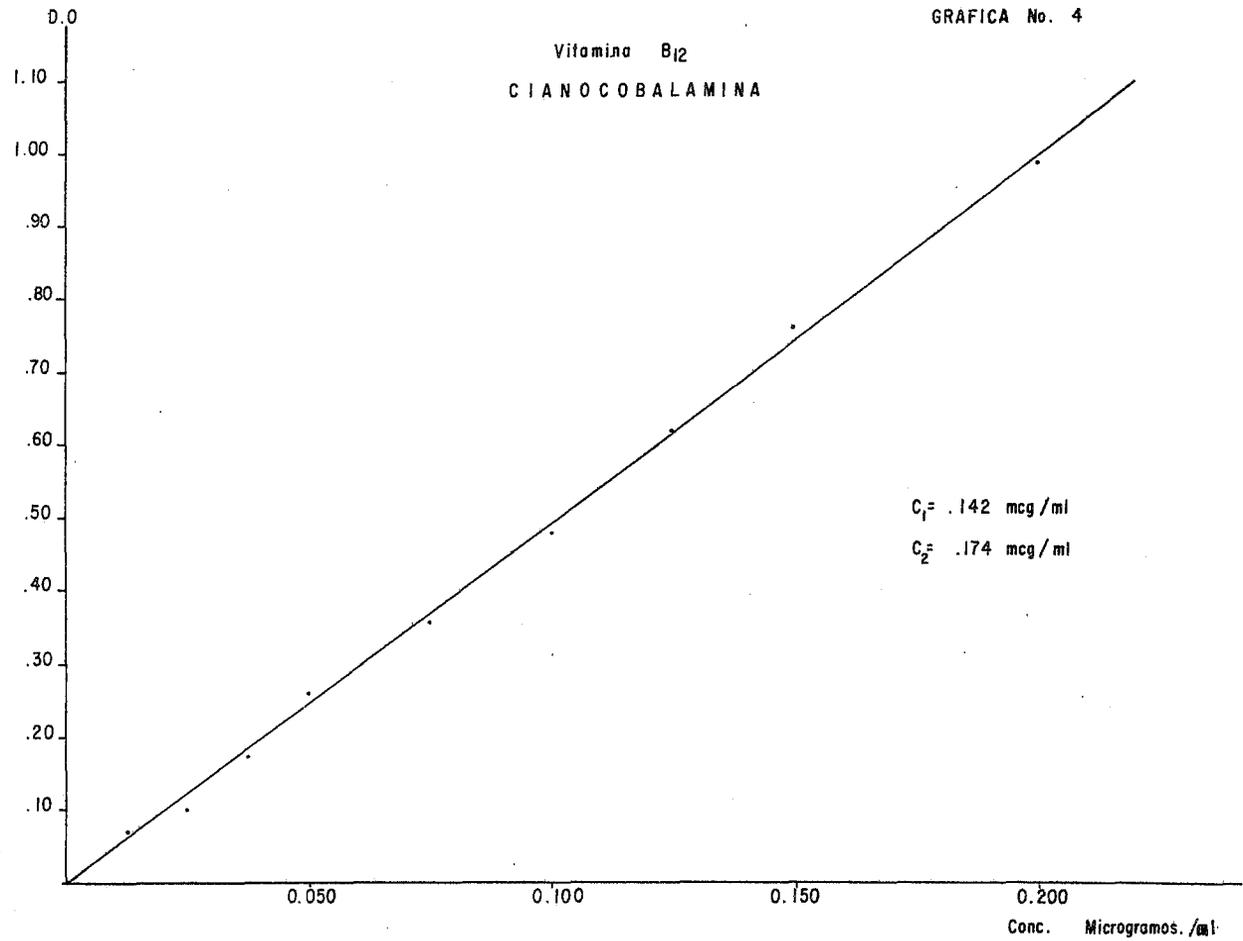


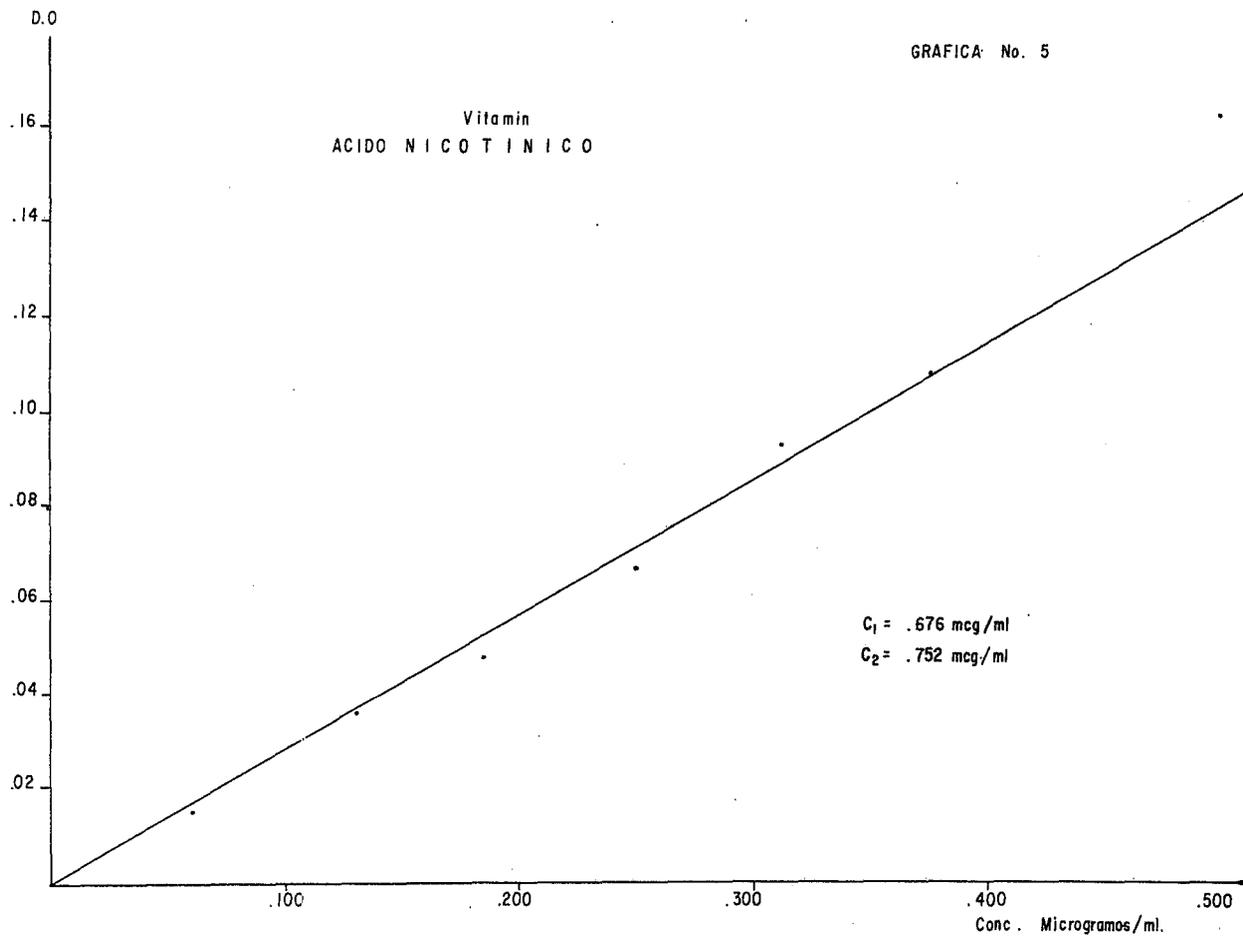




GRAFICA No. 4

Vitamina B₁₂
CIANOCOBALAMINA

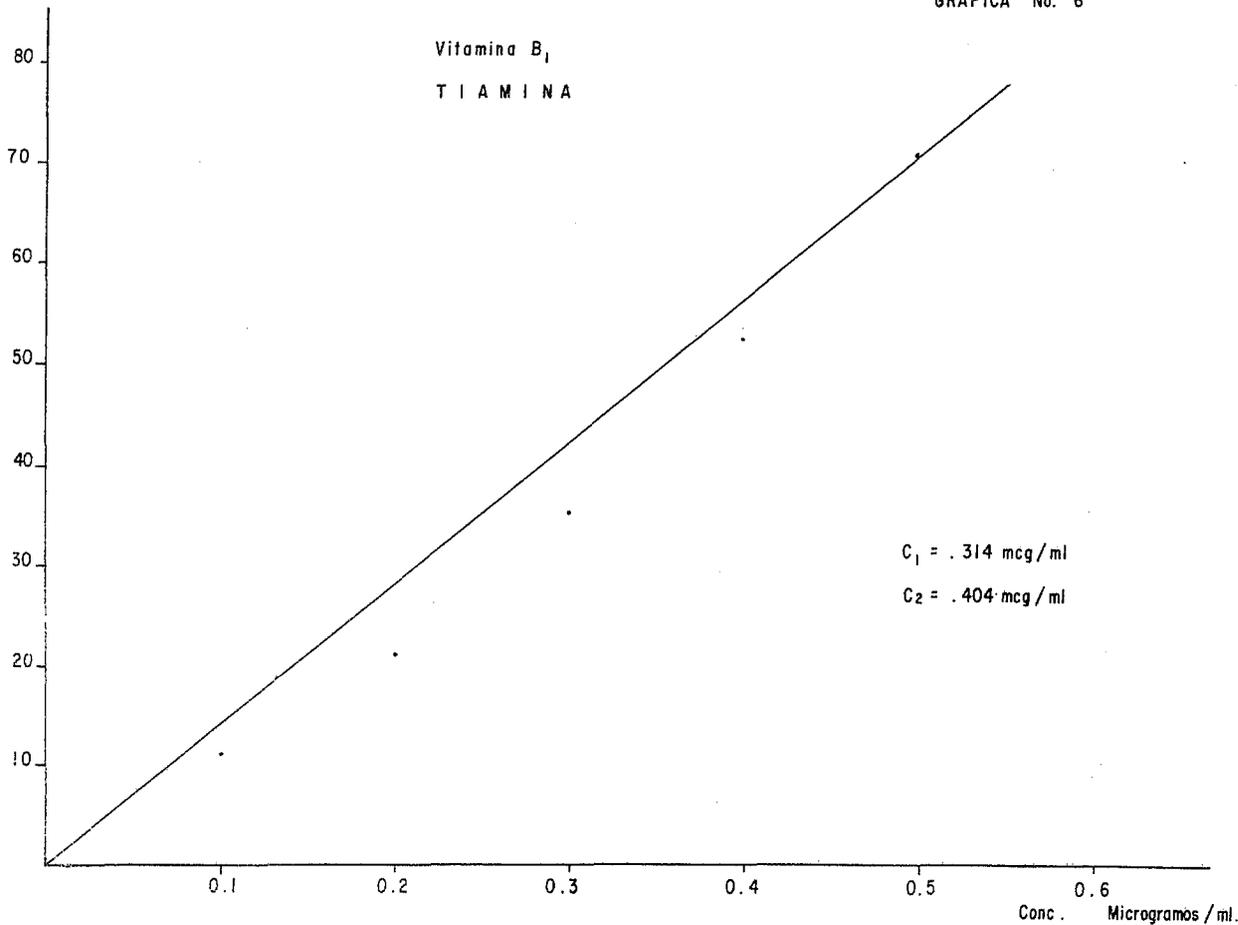




% Fluorecencia

GRAFICA No. 6

Vitamina B₁
T I A M I N A

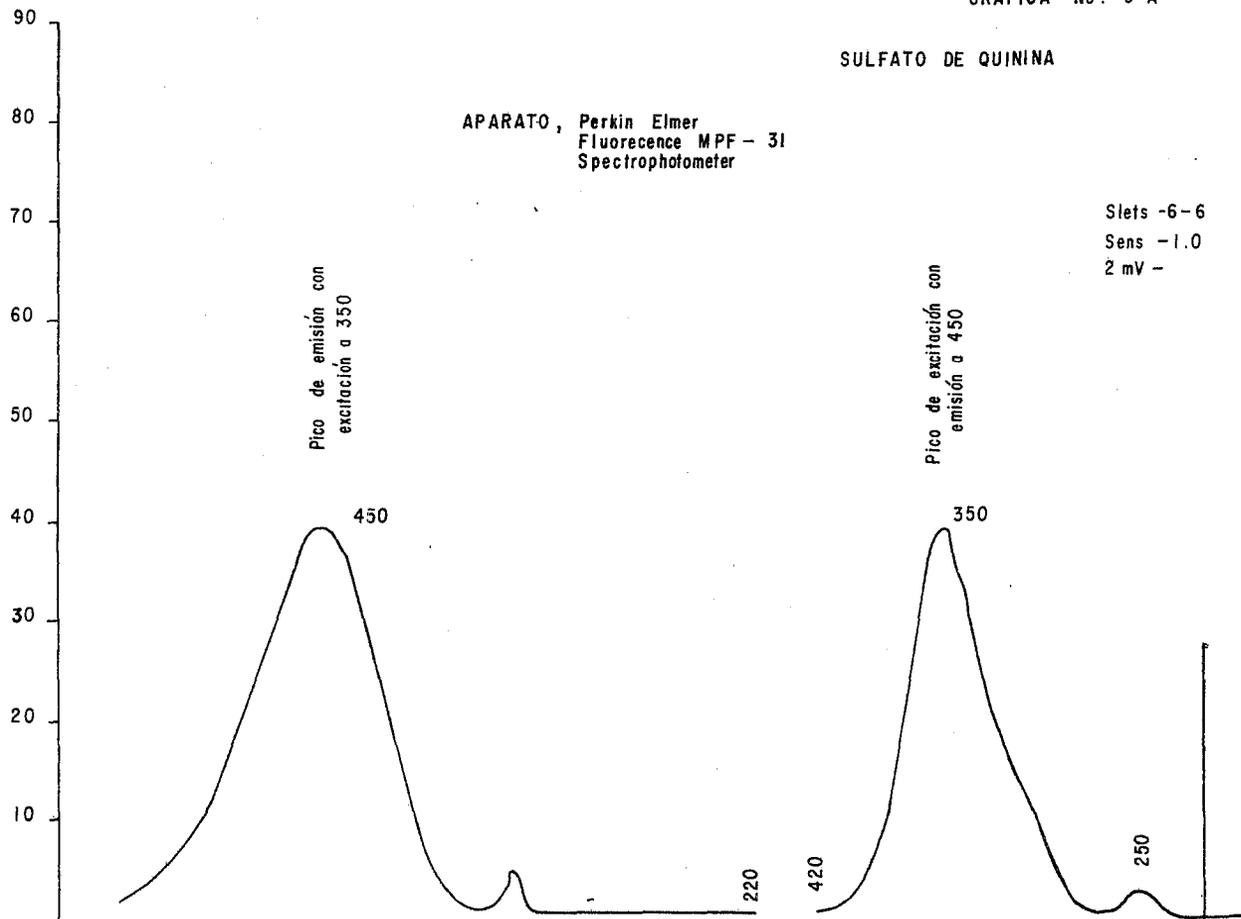


GRAFICA No. 6 A

SULFATO DE QUININA

APARATO, Perkin Elmer
Fluorecence MPF - 31
Spectrophotometer

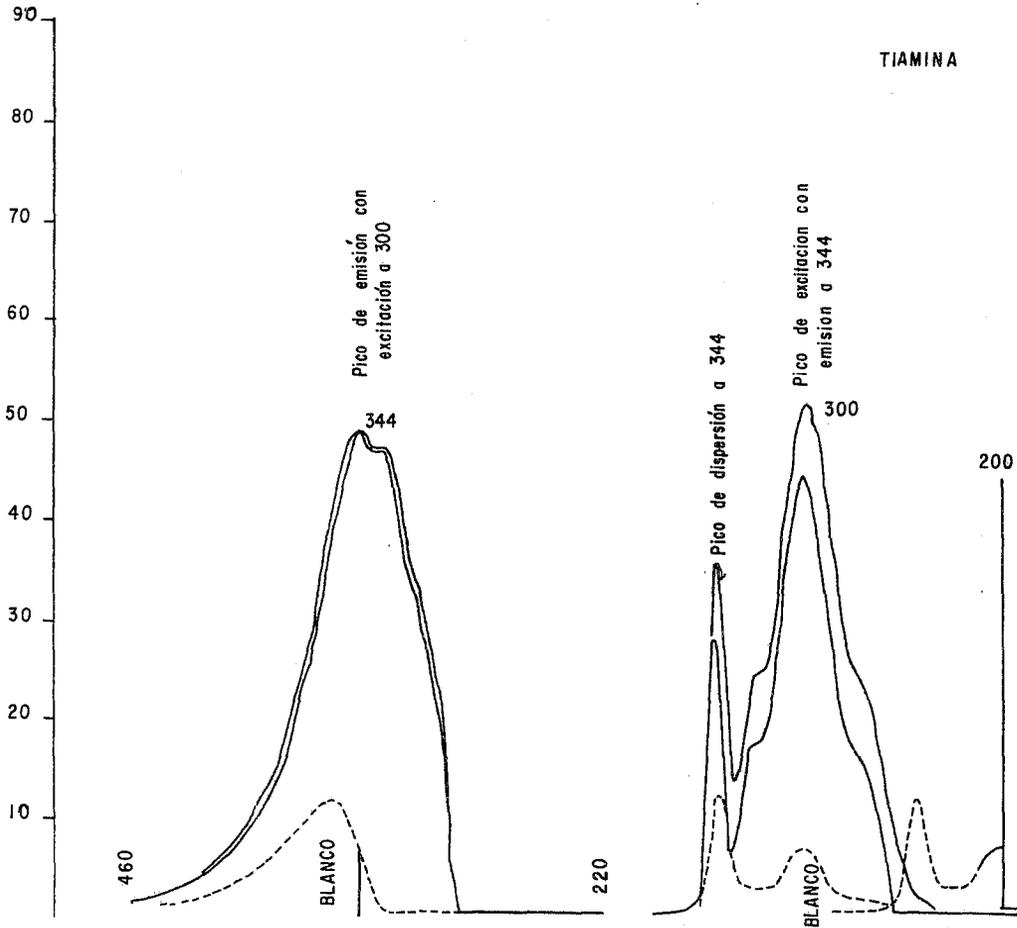
Slits -6-6
Sens -1.0
2 mV -



GRAFICA No. 6 B.

TIAMINA

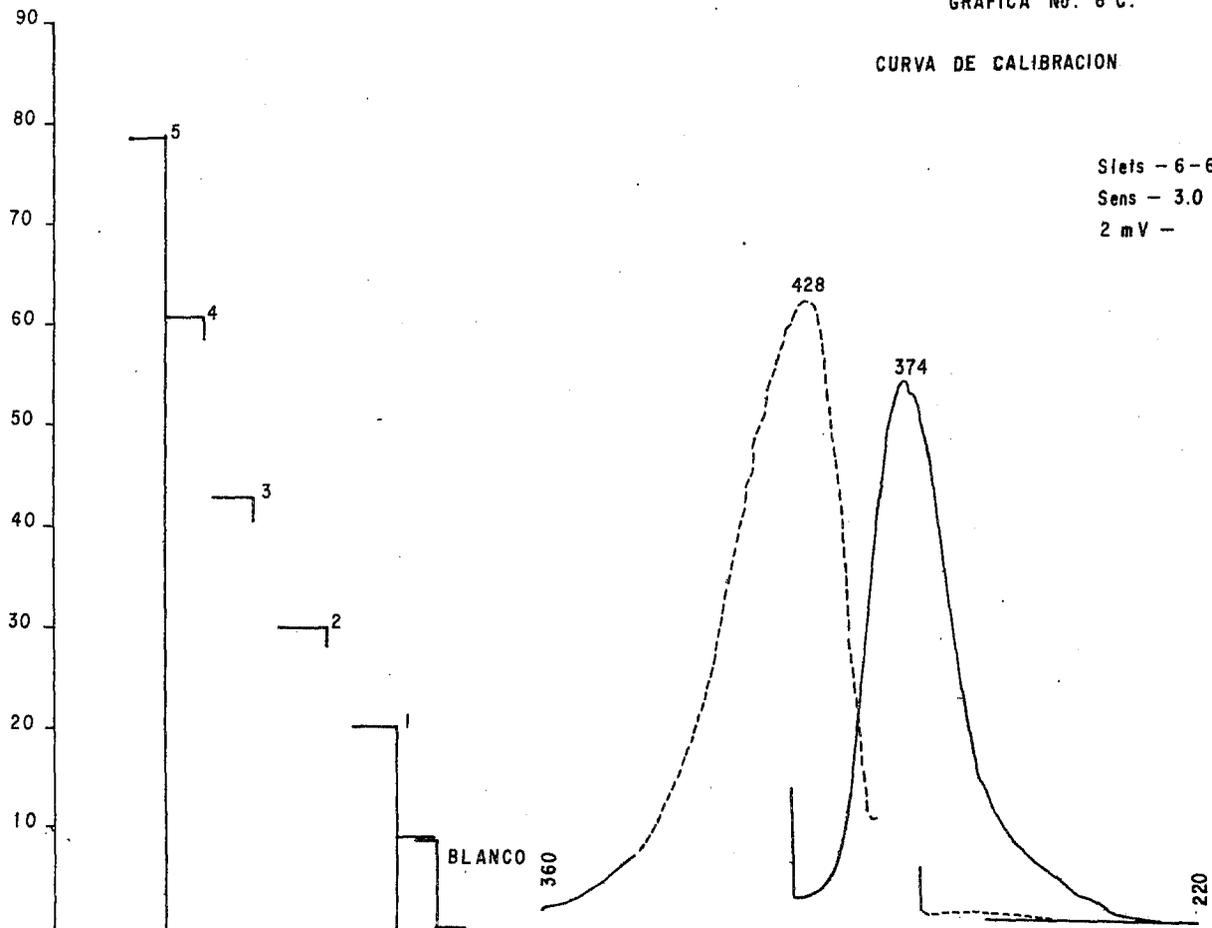
Slats - 6 - 6
Sens - 3.0
2 mV -



GRAFICA No. 6 C.

CURVA DE CALIBRACION

Slats - 6-6
Sens - 3.0
2 mV -



CERO 0.05

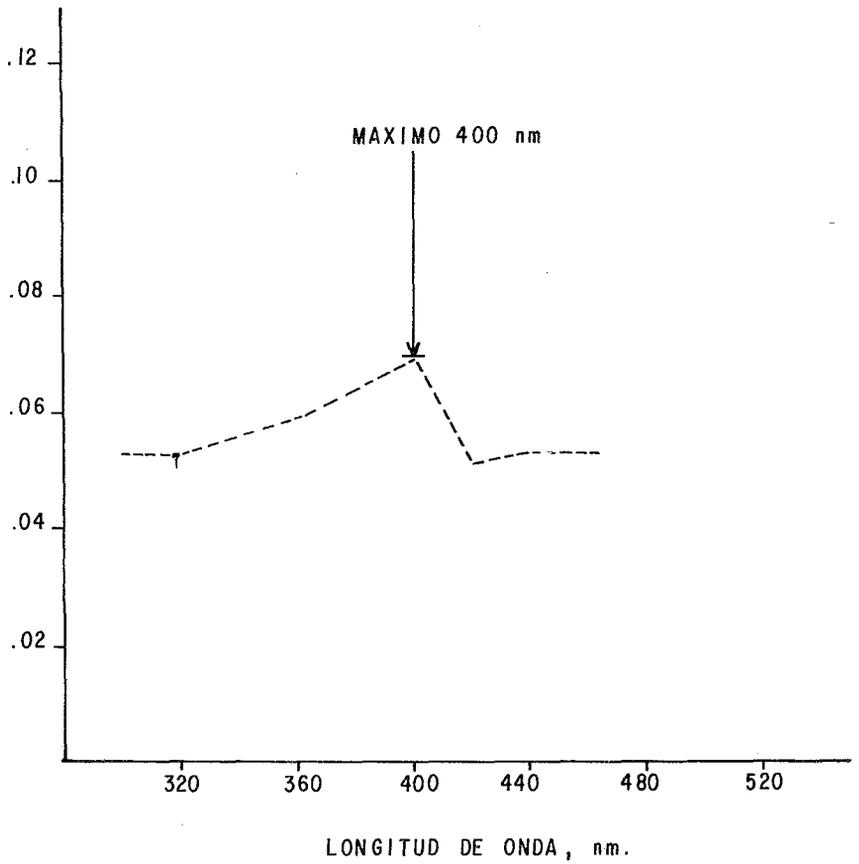
LONGITUD DE ONDA	mW/cm ² X 1000
450	0.050
440	0.053
430	0.054
420	0.051
410	0.057
405	0.067
400	0.069
395	0.063
390	0.062
380	0.064
370	0.062
365	0.061
360	0.059
355	0.056
350	0.056
340	0.056
330	0.053

Lámpara G.E.
15 Watts BLB
Black Light.

Aparato - Monocromador
Tipo - Cernier Turner
Digital Photometer
Tektronix
Detector- Radiometric
Probe. J. 6502

mW/cm²
X
1000

CERO 0.05



CERO 0.043

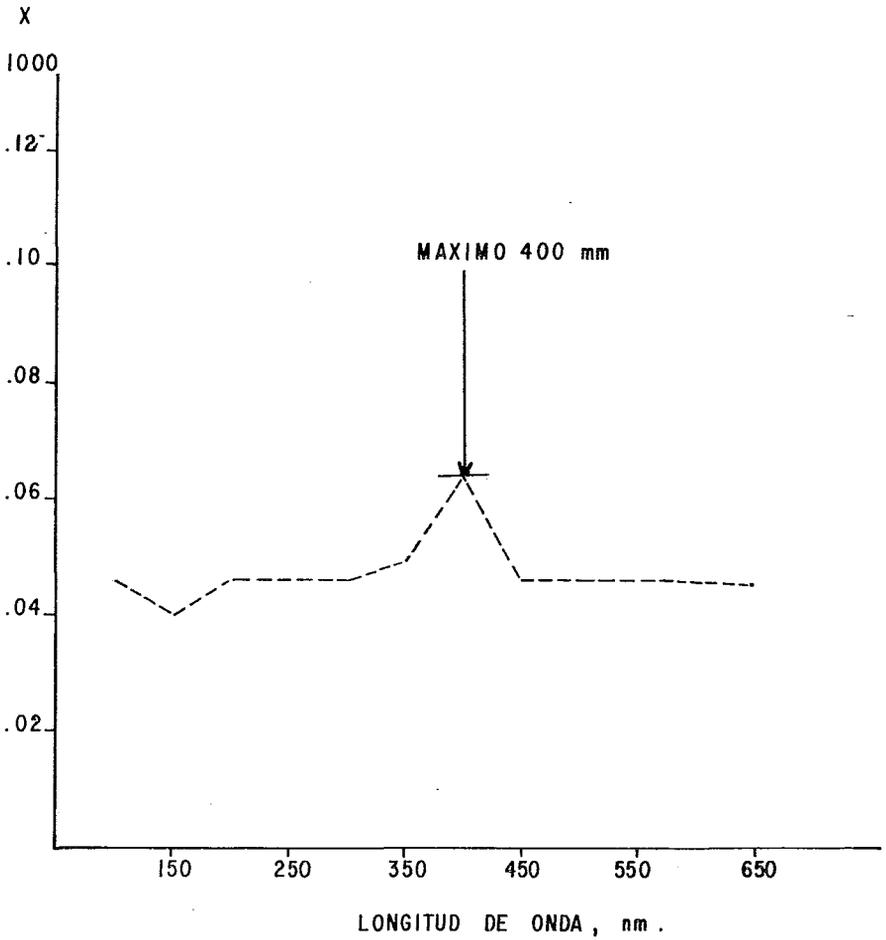
LONGITUD DE ONDA	mW/cm ² X 1000
700	0.046
650	0.045
550	0.046
500	0.046
450	0.046
400	0.063
350	0.049
300	0.046
250	0.046
200	0.046
150	0.040
100	0.046

Lámpara G.E
15 Watts BLB
Black Light.

Aparato - Monocromador
Tipo - Cernie Turner
Digital Photometer
Tektronix
Detector - Radiometric
Probe. J. 6502

mW/cm²

CERO 0.043



X BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anderson B.; Microbiological Assay of Vitamin B₁₂; Clin.--- Pathology, 17: 14, 1974.
- 2.- Anderson J.M.; The Molecular Organization of Chloroplast--- Thylakoides, Biochem. Biophys. Acta 416, pags 191-235, 1975
- 3.- Baltazar M.A. y Santillán S.C.; Predicción de la Productivi-
dad fotosintética del alga Spirulina maxima en Cultivo In--
dustrial, Sosa Texcoco, S.A., 1978.
- 4.- Barton E.C., Wright; The Microbiological Assay of the Vita-
min B-Complex and Amino-acids; Pitman. London Sir Issac Pit
man & Sons LTD. First published, pags 3-32, 46-57, 62-85, -
160-167, 1952.
- 5.- Becton, Dickinson de México, S.A. de C.V.; BBL Manual de --
procedimientos de Laboratorio y de Productos, pags 76, 96,-
141, 147, 1974.
- 6.- Benson W. Sidney; Cálculos Químicos; Una introducción al --
uso de las Matemáticas en la Química, Ed. Limusa, México, -
pags 16-19, 1974.
- 7.- Berg I.M. and Behagel H.A.; Semiautomated Method for Micro
biological Vitamin Assay, Applied Microbiology Mar., Vol,-
23; No. 3, pags 531-542, 1972.
- 8.- Bourges Héctor, El Alga Spirulina, una perspectiva a Largo
plazo; Artículo, pags 19-20, Enero 1975.

- 9.- Bourelly P., Les Algues Bleues ou Cyanophytes Doms "Les Algues D'eau douce algues bleues et rouges". Tome III. Editeper N. Boubée et Cie., Paris, Chap. V , pags 285, 1970.
- 10.- Braun Edmund A.; Black Light Creates Fascinating fluorescence. Printed in the U.S.A., pags 1-44, 1968.
- 11.- Buchanan R.E. and Gibbons N.E.; Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eight Edition; The Williams et Wilkins Company/Baltimore, Part 16, pags. 576-593, 1975.
- 12.- Burke, Jack D., Biología Celular; Ed. Interamericana pags-268-283, 1971.
- 13.- Busson F., Spirulina platensis (Gom) Geitler et Spirulina-geitleri J. de Tomi. Cyanophycies Alimentaires. Thèse, Marseille, 1971.
- 14.- Clement G. Giddeyc., Menzi R.; Aminoacid Composition and Nutritive Value of the Algae. Spirulina maxima, Journal -- Scientific Food and Agriculture, No. 18, pags 497-501, 1967.
- 15.- C. Meyer.; Etude D'une culture d'algues en vue d'une production a grande échelle; Industries Alimentaires et Agricoles No. 11., pags 1445-1450, 1969.
- 16.- Cole W.J., The Structure of Phycocyanobilin, J. Am. Chem. Soc., 89; pags 3643-3645, 1967.
- 17.- Chemical Compounds, Division of Chemistry and Chemical -- Tecnology, National Research Council; Specification and - Criteria for Biochemical Compounds. Ed. National Academic

- of Sciences; Third Edition, Washington D.C., pags 53-60, - 190-191, 1972.
- 18.- Conn, Erick E. and Stumpf P.K., Bioquímica Fundamental; Segunda edición, Editorial Limusa-Wiley S.A., Cap. 8; pags - 165-200, 1972.
- 19.- Cruickshank R; R.R. Gillies, T.C. Dodds, Bacteriology Illustrated; Third edition, Churchill Livingstone. Edinburg and London 1973.
- 20.- Cruz de Palacios Ma. Teresa y Chimal H. Aurora, Efectos - de diferentes pruebas Citoquímicas, principalmente ADNasa, RIBONUCLEASA en células de Spirulina platensis. Memorias - de la II Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Genética, Mazatlán, Sin. Ed. S.M.G., pags 264-277, 1974.
- 21.- Chimal H. Aurora y Cruz de Palacios Ma. Teresa, Estudios - preliminares sobre los efectos de las radiaciones gamma en Spirulina platensis. Memorias de la II Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Genética; Mazatlán, Sin.; Ed. S.M. G. México, D.F., pags. 258-262, Nov. 1975.
- 22.- Dangeard D., Sur une algue bleue alimentaire pour l'home - Arthrospira platensis (Nordst). Act. Soc. Limn. Bordeaux -- Extr. Proc. Verb. 91, 39, 1940.
- 23.- David Maurice, Les Saumures de la Vallée de Texcoco Mexi-- que; Thèse; Centre Régional de Documentation Pédagogique - Service des Impressions., pags 23, 1963.

- 24.- Difco, Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures Ninth Edition, pags 212-218, 221-222, 1961.
- 25.- E. Guérin-Dumartrait et A. Moyses; Caractéristiques Biologiques des Spirulines. Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Associé au C.N.R.S., Université de Paris., Sud, Centre d'Orsay, 91405 ORSAY. Ann. Nutr. Alim., pags 30, -- 489-496, 1976.
- 26.- Farrar W.V., Tecuitlatl; Un vislumbre de la tecnología en la comida azteca. "Natura", Vol. 211., pags 341-343, Jul.- 23, 1966.
- 27.- García Elvira, Espirulina, Algo Flota sobre el agua; "Natura" ., pags 60-65, 1976.
- 28.- Gardner N.L., *Arthrospira maxima* Setchell et Gardner. Uni. Calif. Publis. Bot., 6, 377, 1817.
- 29.- Garnier J., Influence de la Température sur l'accultation ... op. cit., pags 71, 1964.
- 30.- González A.S., Luna L.R., Hernández R., Soriano L.P., Torres G.J., Estudio preliminar de la contaminación por bacterias en un cultivo seminatural de Spirulina; Salud Pública de México, Vol. 18. 1976.
- 31.- Harold A. Harper, Manual de Química Fisiológica; Cuarta -- Edición; Ed: El Manual Moderno S.A., Cap. 7., pags 106-131 México, 1975.

- 32.- Harris, Lorin; Métodos para el Análisis y la Evaluación -
Biológica de los Alimentos para Animales.; Universidad de
Florida, Gainesville., pags , 1970.
- 33.- Heller R.; Biologie Végétale. Vol. II Nutrition et Métabo-
lisme. Paris; Massonn, pags 132, 1969.
- 34.- Holm-Hansen O., Ecology, Physiology and Biochemistry of--
blue-green algae. Ann. Rev. Microbiol.,22; pags 47-70, --
1968.
- 35.- I.F.P., Rapport an comité consultatif des Protéines OAA/-
OMS/FISE. Etat d'Avancement du Procédé de l' IFP de pro--
duction d'algues an 1^{ère} Partie, Réf. 18, 730-1 F., 1^o --
Dic. 1970.
- 36.- Jeuner U.D. et Col., Variations dans la composition et le
taux des pigments des algues bleues en fonction de le com-
position spectrale de l'eclairement (en Russe), Mikrobi-
logiya,34; pags 209-215, 1965.
- 37.- Kendric C. Smith., Photochemical and Photobiological Revi-
ews. Vol. 1. Plenum Publishing Corporation, New York, ---
pags. 71-75, 77-100, 107-110, 1976.
- 38.- Kuzel N.R. and F.W. Kavanagh, Automated system for Analy-
tical Microbiology II; Construction of systene and Evalua-
tion of antibiotic and Vitamins, Journal of Pharmaceuti--
cal Sciences; 60; 5; pags 767-773, 1971.
- 39.- Lang N.J., The fine structure de of blue-green algae. Ann

- Rev. Microbiol., 22, pags 15-64, 1968.
- 40.- Lehninger, Albert, Biochemistry, Worth Publishers, Inc. - New. York., pags 57-139, 491-509, 1970.
- 41.- Lewin R.A., Physiology and Biochemistry of Algae, Academic Press Inc. Second Printing, pags 385, 409-416, 421---432, 560-561, 603-613, 1964.
- 42.- Manrique R.S., Microbiología General., pags 16-17, 41 ---1979.
- 43.- Methods of Analysis of the Association of Official Agri--cultural Chemests; Ed. Board, Eight Edition, Washington - 4 D.C., 1955.
- 44.- Michéle Marche, Extraction et étude des pigments d'une - algue alimentaire les Spirulines., Thèse, Julio 1972.
- 45.- Morrison R.T. and Boyd, Organic Chemistry, Allyn and Bacon, Inc. Boston, pags 418, 1974.
- 46.- Morty F. et Busson F., Danus Cytologiques et sistémati---ques sur Spirulina platensis (Gom), Geitler et Spirulina-geitleri J. de Toni (Cyanophyceae-Osillatoriaceae). C.R. Acad. Sc. Paris, 270, Serie D. 736, (1970), Culture Co---llection of Algae and Protozoa, Cambridge, 1971.
- 47.- Moyses A. & Guyon D., Effect de la température sur l'effi--cacité de la Phycocyanine et de la Chlorophylle chez Aphanocapsa. Coll. Intern. Photosynthese., Gif sur Yvette; C.N.-R.S.

- 48.- Murillo Hector, Tratado elemental de Química Orgánica; Ed. Eclalsa 6a. edición, pags 190-191, México, D.F., 1965.
- 49.- Nakamura Hiroshi, Spirulina, Editorial Reino S.N.A., Agosto 25; pags 5-47, 1978.
- 50.- Official Methods of Analysis of the A.O.A.C., 12 th. Edition, Washington, D.C., pags , 1975.
- 51.- Pinta M. et Busson F., Note préliminaire sur la composition en éléments. Minéraux et oligo-éléments de Spirulina platensis. (Gom), Geitler et de Spirulina maxima (Setch-et garden Geitler Medicine Tropicale; 29, 617, 1969.
- 52.- Ramírez Barba L., Macrobiótica, Requiem por la medicina oficial, 4a. Edición, pags 169-170, Sep. 1978.
- 53.- Roderick K. Clayton, Luz y Materia Viviente, Vol I; La parte Física, Ed. Reverte S.A. pags 55-59, 77, 1973.
- 54.- Roderick K. Clayton, Luz y Materia Viviente, Vol. II ; La parte Biológica, Ed. Reverte S.A. pags 2-54, 147-178, --- 1974.
- 55.- Rolf Strohecker Heinz Henning, Vitamin Assay, First Edition, Verlag Chemie, pags 59-64, 1968.
- 56.- Rolf Strohecker Heinz M. Henning, Vitamin Assay Tested methods. Verlag Chemie G.M.B.H., Weinheim Bergstr, pags 323-341, 1966.
- 57.- Salter W.T., Tratado de Farmacología Aplicada, Tomo II, - Editorial Interamericana S.A., México., Cap. 22, pags 734

-760, 1963.

- 58.- The United States Pharmacopeia, XVIII, Eighteenth Revision official from July 1, United States Pharmacopeia Convention, Inc. 12600 Twin Brook Parkway, Rockville, Md. --- 20851, pags 153-155, 887-890, 910-911, 1974.
- 59.- The United States Pharmacopeia, XIX, Nineteenth Revision-official from July 1, United States Pharmacopeia Convention, Inc. 12601 Twin Brook Parkway, Rockville, Md. 20852 pags 627-630, 1975.
- 60.- Zarrouk C., Contribution a l'étude d'une Cyanophycie. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima (Setch et Garner), Geitler, Thèse Doct. Sc. Appl., Paris, 1966.
- 61.- B. Monties, Radiación - Ultravioleta y Fotosíntesis Pags- 195-205, 1973
- 62.- Flaska, H.A., Barnard Jr., A.J., Sturrock, P.E., Química Analítica Cuantitativa, Vol. I. Ed. Continental S.A.pags- 499-501, 1973.
- * DATOS PROPORCIONADOS POR SOSA TEXCOCO S.A. México, D.F. 1978.