

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

PURIFICACIÓN DE FICOCIANINA EXTRAÍDA DE LA MICROALGA ROJA,

Rhodospirillum rubrum



ALEJANDRA LÓPEZ VÁZQUEZ

Hermosillo, Sonora

Junio del 2011.

Repositorio Institucional UNISON



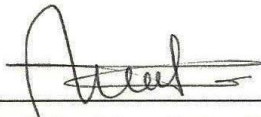
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Alejandra López Vázquez, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Licenciado en Biología con opción en Biotecnología.



Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta

Director de Tesis



Dr. Marco Antonio López Torres

Secretario



Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán

Vocal



Dr. Miguel Ángel Valdez Covarrubias

Suplente

DEDICATORIA

El presente trabajo de tesis se lo dedico a mi familia, quienes me han apoyado en el transcurso de mi vida y en la realización de mi tesis.

A mí mamá, María Elena Vázquez Morgado y mi papá, José Luis López Santoyo, Quienes me impulsan a superarme día a día. A mi hermano, José Luis López Vázquez (Pepin), por ayudarme cuando lo he necesitado. Ustedes son mis pilares.

Alberto, a pesar de la distancia, te llevo conmigo todos los días.

Los amo infinitamente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Sonora, por brindarme las herramientas e instalaciones para desarrollarme a nivel profesional y personal.

Le agradezco a mi directora y tutora de Tesis, Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta, por su apoyo, orientación y paciencia. Por abrirme las puertas de su laboratorio y dirigirme durante el desarrollo de mi trabajo, su apoyo fue y será parte de mi formación. Por su gran corazón, le estaré siempre agradecida.

También le agradezco a mis sinodales, por su orientación durante mi tesis.

Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán, por su apoyo y confianza ante mi trabajo. Por la gran oportunidad que me ha obsequiado, lo cual me ha hecho crecer a nivel profesional y personal, le estaré siempre agradecida.

Dr. Marco Antonio López Torres, gracias por sus consejos, enseñanzas y apoyo, tanto en mi trabajo de tesis, como en otros trabajos de investigación que tuve la fortuna de realizar con usted, para mí es un ejemplo a seguir.

Dr. Miguel Ángel Valdez Covarrubias, por su orientación y apoyo en mi tema de tesis, siempre con toda disposición en ayudarme para cualquier duda o necesidad que se me presentara para realizar mi trabajo.

A todos mis profesores y compañeros de clase y laboratorio que en el transcurso de la carrera aportaron su granito de arena a mi formación:

A mis grandes maestros del laboratorio, M.C. Alma Delia Rascón Durán y M.C. Jesús Rafael Ávila Barceló por enseñarme las técnicas de cultivo celular, cromatografía, electroforesis y espectrofotometría, pero sobre todo por la paciencia que me tuvieron y el tiempo que me dedicaron. Les agradeceré eternamente, su título de maestros lo ganaron muchísimo antes de titularse.

Le agradezco a la Dra. Adriana Guadalupe Básaca Loya, quien gracias a su trabajo y establecimiento de la metodología para extracción de ficoeritrina de *R. marinus* apoyo inmensamente mi trabajo y por su siempre amable disposición para resolver todas mis dudas.

A mis compañeros de laboratorio quienes no sólo me ayudaron con mi trabajo, sino que también aprendí muchas cosas de sus propias investigaciones y me transmitieron nuevos conocimientos, Alejandra Bórquez Kishi por ayudarme con técnicas de electroforesis y brindarme su agradable compañía y amistad, gracias por escucharme.

Gracias a Alfonso García Galaz, quien aunque llegó al final de mi trabajo, me proporciono información valiosa sobre mi investigación y me permitió realizar una retroalimentación de mi trabajo. Una gran persona y un excelente maestro.

A todas las hermosas personas que me rodearon día a día en la Universidad, salón de clases, laboratorios, bibliotecas y oficinas, que me acompañaron, aconsejaron y brindaron una sonrisa para iniciar mi día e impulsaron a seguir aprendiendo. P-VANG, Mitzi, Betza, Nidya, Tere, Alma, Raquel, Priscila, z11, profesores, compañeros, amigos.

Se los agradezco de todo corazón.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	1
LISTA DE FIGURAS	2
RESUMEN	4
I. INTRODUCCIÓN	5
II. ANTECEDENTES	7
II.1. Ficobiliproteínas	7
II.2. Clasificación de las Ficobiliproteínas	7
II.3. Ubicación de las Ficobiliproteínas	9
II.4. Estructura de las Ficobiliproteínas	10
II.5. Función de las Ficobiliproteínas	12
II.6. Las Ficobiliproteínas como Almacenamiento de Compuestos de Nitrógeno	13
II.7. Generalidades de la Ficocianina	13
II.8. Aplicaciones de las Ficobiliproteínas	14
II.8.1. Ingrediente Nutricional y Natural en Colorantes para Comida y Cosméticos	14
II.8.2. Marcador Fluorescente en Investigaciones Biomédicas	15
II.8.3. Propiedades Farmacológicas	16
II.8.3.1. Antioxidante	16
II.8.3.2. Antiproliferativo	16
II.9. Extracción y Purificación de Ficocianina	20
II.9.1. Cromatografía	22
II.9.2. Pureza	25
II.10. <i>Rhodospirillum rubrum</i> como Fuente de Ficobiliproteínas	25
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. HIPÓTESIS	27
V. OBJETIVOS	28
V.1. Objetivo general	28
V.2. Objetivos específicos	28
VI. METODOLOGÍA	29

VI.1. Cultivo de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	29
VI.1.1. Preparación del Material para Cultivo	29
VI.1.2. Medio de Cultivo	29
VI.1.3. Método de Cultivo	30
VI.2. Obtención de Biomasa	31
VI.3. Extracción y Purificación de Ficocianina	31
VI.3.1. Extracción y Precipitación de Proteínas	31
VI.3.2. Cromatografía de Filtración en Gel	32
VI.3.3. Cromatografía de Intercambio Aniónico	32
VI.3.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución	33
VI.4. Caracterización de Ficocianina	34
VI.4.1. Determinación de Pureza	34
VI.4.2. Concentración de Ficocianina	34
VI.4.3. Determinación de Peso Molecular por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	34
VII. RESULTADOS	36
VII.1. Cultivo de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	36
VII.1.1. Obtención de Biomasa	36
VII.2. Purificación de Ficocianina	36
VII.2.1. Extracción y Precipitación de Proteínas	36
VII.2.2. Cromatografía de Filtración en Gel	38
VII.2.3. Cromatografía de Intercambio Aniónico	39
VII.2.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución	41
VII.2.5. Sumario de Pureza contra Concentración de Ficocianina	43
VII.2.6. Determinación de Peso Molecular por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	45
VIII. DISCUSIÓN	47
VIII.1. Extracción y Precipitación de Proteínas	47
VIII.2. Cromatografías	49
VIII.3. Determinación de Peso Molecular por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	52

IX. CONCLUSIONES	53
X. RECOMENDACIONES	54
XI. LITERATURA CITADA	55

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Clasificación de ficobiliproteínas en las algas verde-azules y rojas. Tomado de Glazer y Hixson (1975)	8
Tabla II	Potenciales farmacéuticos de la ficocianina, los mecanismos fisiológicos sugeridos responsables de los efectos y los sistemas experimentales. Tomado de Eriksen (2008)	19
Tabla III	Procedimientos usados para la purificación de ficocianina con pureza final. Tomado de Eriksen (2008)	24
Tabla IV	Composición del medio Ersdchreiber	30
Tabla V	Sumario de pureza, incremento de pureza, concentración y volumen de fracción con ficocianina en los diferentes pasos de purificación a partir de la microalga roja, <i>R. marinus</i>	44
Tabla VI	Índices de pureza de ficocianina de la precipitación de proteínas calculados para <i>R. marinus</i> , contra los calculados por Patel <i>et al.</i> (2005), para <i>Spirulina sp.</i> , <i>Phormidium sp.</i> y <i>Lyngbya sp.</i>	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ensamblaje del ficobilisoma (PE=Ficoeritrina, PC=Ficocianina y AP=Aloficocianina). Tomado de Merchants (2010).	10
Figura 2	Ficobilinas y sus enlaces peptídicos en las ficobiliproteínas. Tomado de Grossman <i>et al.</i> (1993).	12
Figura 3	Extracción y purificación de ficobiliproteínas. Tomado de Prasanna <i>et al.</i> (2007).	21
Figura 4	Barrido espectral del extracto crudo de <i>R. marinus</i> , posterior a la precipitación de proteínas con sulfato de amonio (40% de saturación).	37
Figura 5	Barrido espectral del extracto crudo de <i>R. marinus</i> , posterior a la precipitación de proteínas con sulfato de amonio (60% de saturación).	38
Figura 6	Gráfica de absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas a partir de Sephadex G-25. Se observa un pico alrededor de los 625 nm, característico de ficocianina.	39
Figura 7	Espectro de fracciones de cromatografía de intercambio aniónico. La absorbancia para ficoeritrina (545 nm), ficocianina (615 nm) y aloficocianina (650 nm) para cada fracción se representa por la línea roja, azul y morada, respectivamente.	39
Figura 8	Espectro de fracciones de cromatografía de Intercambio Aniónico. La absorbancia para ficoeritrina (545 nm), ficocianina (615 nm) y aloficocianina (650 nm) para cada fracción se representa por la línea roja, azul y morada, respectivamente.	40
Figura 9	Espectro de pool de ficocianina a partir de la cromatografía de intercambio aniónico, a) fracción 1 (pureza > 3), b) fracción 2 (pureza > 2 < 3) y c) fracción 3 (pureza > 1 < 2).	41
Figura 10	Barrido espectral de fracciones obtenidas por HPLC, a) fracción 1 HPLC, b) fracción 2 HPLC y c) fracción 3 HPLC.	42

Figura 11	Espectros de absorción durante los diferentes pasos de extracción y purificación de ficocianina: saturación con sulfato de amonio al 40% (— —), saturación con sulfato de amonio al 60% (•••), cromatografía de filtración en gel (- - -), cromatografía de intercambio aniónico (— ·), cromatografía líquida de alta resolución (—).	43
Figura 12	Pureza de la fracción 1 (pureza de ficocianina > 3 en la cromatografía de intercambio aniónico). Donde en el eje x: 1) precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ (40%), 2) precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ (60%), 3) filtración en gel G-25, 4) cromatografía de intercambio aniónico, 5) HPLC.	45
Figura 13	PAGE-SDS del pool de ficocianina con pureza mayor a 4 obtenida por HPLC.	46
Figura 14	Espectro de absorción reportado por Patel <i>et al.</i> (2005), del extracto crudo de la cianobacteria <i>Lyngbya sp.</i> , posterior a la precipitación con sulfato de amonio (50% saturación).	48
Figura 15	Espectro de ficocianina extraída de la cianobacteria <i>Synechococcus sp.</i> IO9201, a partir de cromatografía por intercambio aniónico reportado por Abalde <i>et al.</i> (1998).	49
Figura 16	Espectro de absorción de C-ficocianina reportado por Hilditch <i>et al.</i> (1991), exhibiendo picos característicos a 280, 360 y 620 nm.	51

RESUMEN

En este trabajo se describe la extracción y purificación de la ficocianina obtenida de la microalga roja *Rhodospirillum rubrum*. El proceso de purificación para la ficocianina consistió en una serie de pasos de extracción por fragmentación celular manual y sonicación de las células de *R. rubrum*. La ficocianina fue extraída por precipitación doble con sulfato de amonio (40 y 60%) y una posterior desalación por cromatografía en gel de Sephadex G-25, finalmente la purificación de la ficocianina del resto de las ficobiliproteínas se realizó por cromatografía de intercambio aniónico empleando una columna Q-Sepharosa con un gradiente de elución con buffer de fosfato (0.010 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pH 7.0) de diferente fuerza iónica (0.1 M, 0.25 M y 0.5 M de NaCl) y posteriormente se aplicó una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), para lograr un alto grado de pureza. La pureza de ficocianina fue estimada por caracterización espectroscópica UV-visible y electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). La pureza de la ficocianina obtenida a través de los procesos de extracción y purificación de ficocianina fue calculada. El grado más alto de pureza obtenido para la ficocianina fue de 4.6, con un pico de absorbancia máximo a 615 nm, característico de dicha proteína. En SDS-PAGE, la ficocianina purificada mostró dos bandas electroforéticas características de las subunidades α y β , con pesos moleculares de 18.4 y 20.6 kDa, respectivamente. Los resultados anteriores muestran que se puede obtener Ficocianina con un alto grado de pureza a partir de la microalga *Rhodospirillum rubrum*, a través de la metodología empleada en este trabajo, lo cual se establece como una opción viable para la obtención de la proteína pura.

I. INTRODUCCIÓN

Las ficobiliproteínas son proteínas con un grupo prostético tetrapirrol lineal (bilina), que se encuentra covalentemente ligado a un residuo específico de cisteína de la proteína (Bermejo *et al.*, 1997). Estas proteínas son solubles en agua y están compuestas por dos subunidades polipeptídicas α y β , en algunas fuentes la ficoeritrina presenta una tercera subunidad, γ (Hilditch *et al.*, 1991). Las ficobiliproteínas actúan como pigmentos accesorios para la captación de luz en el aparato fotosintético de cianobacterias (algas verde-azules, procariotas), rodofitas (algas rojas, eucariotas) y criptomónadas (algas eucariotas unicelulares biflageladas), donde se encuentran organizadas en complejos supramoleculares denominados ficobilisomas, ubicados en la superficie de la membrana tilacoidal (Bermejo *et al.*, 1997; Sekar y Chandramohan, 2008).

Las ficobiliproteínas se clasifican en cuatro grupos según sus características de absorción y fluorescencia: ficoeritrina ($\lambda_{\max}=490-570\text{nm}$); ficocianina ($\lambda_{\max}=590-625\text{nm}$), ficoeritrocianina ($\lambda_{\max}=560-600\text{nm}$) y aloficocianina ($\lambda_{\max}=560-600\text{nm}$) (Glazer, 1988; Sun y Wang, 2003). Debido a que las ficobiliproteínas absorben luz en la región visible (450-650 nm) donde la clorofila α absorbe ineficientemente, contribuyen en un 30 a 50% de la capacidad de captación de luz (Hilditch *et al.*, 1991).

La ficobiliproteínas son utilizadas en numerosas aplicaciones en la industria alimentaria, cosméticos, biotecnología, diagnósticos y medicina (Eriksen, 2008; Sekar y Chandramohan, 2008). La ficocianina es el pigmento azul natural más importante de la industria alimentaria en los procesos de goma de mascar, dulces, refrescos, productos de leche y gelatinas; para cosméticos se utiliza en labiales y delineadores (Santiago-Santos *et al.*, 2004; Sekar y Chandramohan, 2008). Además, debido a sus propiedades de fluorescencia, pueden ser utilizadas como marcadores fluorescentes (Abalde *et al.*, 1998; Oi *et al.*, 1982). Las propiedades farmacológicas atribuidas a la ficocianina y otras ficobiliproteínas incluyen: actividad antioxidante, anti-inflamatoria, neuroprotectora y hepatoprotectora (Eriksen, 2008; Romay *et al.*, 2003).

Las microalgas son una fuente importante de ficobiliproteínas y entre las más explotadas para su producción están la cianobacteria *Spirulina*, para obtención de ficocianina

y el alga roja *Porphyridium* para ficoeritrina (Sekar y Chandramohan, 2008). Las ficobiliproteínas son fácilmente aisladas como complejos proteína-pigmento. Los procesos de purificación son facilitados debido a que las ficobiliproteínas son muy solubles en agua, permitiendo la separación de estas moléculas de otros pigmentos. Las ficobiliproteínas puras a partir de extractos de alga son usualmente obtenidas por una combinación de precipitación con sulfato de amonio y métodos cromatográficos como intercambio aniónico, exclusión por tamaño e interacciones hidrofóbicas, además de su caracterización por electroforesis SDS-PAGE y espectroscopia (Abalde *et al.*, 1998; Tchernov *et al.*, 1999; Eriksen, 2008).

Se han descrito estudios con la microalga roja *Rhodospirillum rubrum* sobre la purificación, caracterización y evaluación de actividad antiproliferativa de la B-ficoeritrina (Molina *et al.*, 2007; Básaca-Loya *et al.*, 2009; Rascón-Durán, 2009). Sin embargo, actualmente no se tienen estudios sobre purificación de ficocianina a partir de *R. rubrum*. Debido a la importancia biotecnológica de las ficobiliproteínas, entre ellas la ficocianina y el antecedente de los estudios mencionados, tanto como el rápido y fácil crecimiento de esta microalga bajo condiciones de laboratorio, el presente trabajo tiene como objetivo purificar la ficocianina obtenida a partir de la microalga roja *R. rubrum* empleando precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía líquida de alta resolución, con la finalidad de obtener la ficocianina con un alto grado de pureza.

II. ANTECEDENTES

II.1 Ficobiliproteínas

La clorofila es la parte esencial del centro de reacciones fotosintéticas, absorbe la luz entre 450 y 600 nm débilmente, por lo tanto, es bastante ineficiente en la captación de luz solar. Para superar este inconveniente, los organismos fotosintéticos han desarrollado los llamados pigmentos accesorios o pigmentos captadores de luz. Estos pigmentos colectan eficientemente la luz solar debido a su fuerte absorción en las regiones de mínima absorción de la clorofila y transfieren la energía absorbida a la clorofila del centro de reacción. Estos pigmentos son las ficobiliproteínas: ficoeritrina (FE), ficocianina (FC) y aloficocianina (AFC) (Friedrich *et al.*, 1981).

Las ficobiliproteínas son complejos proteína-pigmento envueltos en la captación de luz en tres grupos de organismos fotosintéticos – las cianobacterias, las rodofitas (algas rojas) y criptomónadas. Las ficobiliproteínas son proteínas solubles en agua de colorido brillante unidas covalentemente a tetrapirroles de cadena abierta llamados ficobilinas. La función de las ficobiliproteínas es la de absorber la luz en la región visible (450-650 nm) donde la clorofila α absorbe de forma ineficiente y contribuyen con el 30 a 50% de la capacidad de captación de luz de estas células (Abalde *et al.*, 1998; Hilditch *et al.*, 1991).

II.2. Clasificación de las Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas se clasifican en cuatro grupos principales de pigmentos según sus características de absorción y fluorescencia: ficoeritrina ($\lambda_{\max}=565-575\text{nm}$); ficocianina ($\lambda_{\max}=615-640\text{nm}$) ficoeritrocianina ($\lambda_{\max}=575\text{nm}$) y aloficocianina ($\lambda_{\max}=650-655\text{nm}$) (Sun y Wang, 2003). En la Tabla 1, se muestran los tipos de ficobiliproteínas, así como su

distribución, organismos representativos de los cuales son extraídas y las características de absorbancia y fluorescencia con las cuales son clasificadas (Glazer y Hixson, 1975).

Tabla I. Clasificación de ficobiliproteínas en las algas verde-azules y rojas. Tomado de Glazer y Hixson (1975). *Las abreviaciones dadas en el paréntesis identifican los grupos prostéticos tetrapirroles responsables de la máxima absorción: PCB, Ficocianobilina; PEB, ficoeritrobilina; PUB, ficourobilina. Han existido algunas disputas si la ficourobilina es una forma natural distinta de la ficobilina o un compuesto de degradación de la ficoeritrobilina. En este momento, la evidencia parece soportar el punto de vista de que la ficourobilina es un grupo prostético. (S)=hombro.

Ficobiliproteínas	Distribución	Organismos representativos	Máxima absorbancia en la región visible (nm)	Emisión.máxima de fluorescencia (nm)
Aloficocianina	Algas verde-azules y rojas	<i>Porohyridium cruentum</i>	650 (PCB)*	660
C-ficocianina	Algas verde-azules y rojas	<i>Anacystis nidulans</i>	620(PCB)*	648
C-ficoeritrina	Algas verde-azules	<i>Schizothrix calcicola</i>	565(PEB)*	577
R-ficocianina	Algas rojas	<i>Porphyridium cruentum</i>	617(PCB)>555 (PEB)	636
R-ficoeritrina	Algas rojas (verde-azules)	<i>Ceramium rubrum</i>	567(PEB)>538 (PEB)>498 (PUB)	578
B-ficoeritrina	Algas rojas (verde-azules)	<i>Porphyridium cruentum</i>	545(PEB)>563 (PEB)>498(S) (PUB)*	575

La ficocianina y la ficoeritrina fueron originalmente designadas con un prefijo C- o R- para indicar el origen ya sea cianofitas (algas verde-azules) o rodofitas (algas rojas), respectivamente. La designación B- fue agregada para especificar una ficoeritrina espectrofotométricamente distinta del alga roja *Smithora naiadum*, un miembro de las *Bangiales*. En el presente, los prefijos C-, B- y R- son usados para distinguir tres tipos de ficoeritrinas, aquellas que tienen uno, dos o tres picos mayores diferentes en el espectro de la región visible, sin tener en cuenta el grupo algal del cual han sido aisladas (Glazer y Hixson, 1975). Mientras que los prefijos C y R, en ficocianina, indican si la proteína proviene de cianobacterias o de algas rojas, respectivamente (Prasanna *et al.*, 2007). En la Tabla 1 se muestra la clasificación de ficobiliproteínas en las cianobacterias y algas rojas. Los datos

fueron obtenidos en soluciones acuosas diluidas de las biliproteínas nativas cerca de un pH neutro, tomados de Glazer y Hixson (1975).

II.3. Ubicación de las Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas están altamente organizadas en complejos proteicos macromoleculares denominados ficobilisomas (PBS), lo cuales se encuentran unidos a la superficie externa de los tilacoides o membrana fotosintética, constituyendo el aparato de captación de luz fotosintético II (Grossman *et al.*, 1993; Hilditch *et al.*, 1991). Las rodofitas y cianofitas presentan *in vivo* estos ficobilisomas, mientras que las criptomónadas no se agregan más allá de estados diméricos sin formar ficobilisomas (Holzwarth *et al.*, 1983).

Los ficobilisomas tienen dos regiones diferentes, un núcleo compuesto principalmente de aloficocianina, formando una conexión física con la superficie externa de las membranas tilacoidales y están a menudo asociados con el fotosistema II. Alrededor del núcleo están una serie de extensiones denominadas rod, compuestas por ficocianinas y/o ficoeritrinas, su parte interna está compuesta por hexámeros de ficocianina mientras que la parte externa por hexámeros de ficoeritrina (Figura 1). Los discos de ficobiliproteínas (trímeros y hexámeros) están ensamblados con ayuda de enlaces polipeptídicos dentro de los ficobilisomas (Apt *et al.*, 1995; Sun y Wang, 2003; Eriksen, 2008). La concentración de las ficobiliproteínas dentro de los ficobilisomas depende del organismo y su estado ambiental y pueden constituir el 50% de las proteínas solubles en la célula (Grossman *et al.* 1993).

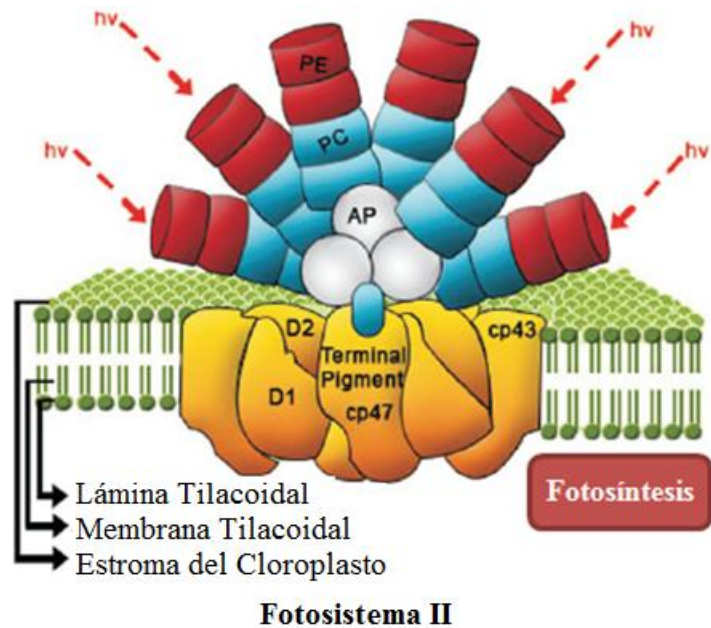


Figura 1. Ensamblaje del ficobilisoma (PE=Ficoeritrina, PC=Ficocianina y AP=Aloficocianina). Tomado de Merchants (2010).

II.4. Estructura de las Ficobiliproteínas

Cada una de las diferentes ficobiliproteínas está constituida por dos subunidades polipeptídicas no idénticas, α y β . Existe una tercer subunidad, γ , la cual se encuentra en pequeñas cantidades en la ficoeritrina de ciertas fuentes. Generalmente, la subunidad α tiene un peso molecular de entre 15 y 20 kDa y la subunidad β tiene un peso molecular de entre 17 y 22 kDa. Las subunidades α y β están presentes en (α/β) -monómeros. La unidad básica de ensamblaje para todas las ficobiliproteínas es de $(\alpha/\beta)_3$ -trímeros, los cuales también pueden agregarse dentro de $(\alpha/\beta)_6$ -hexámeros. Los ficobilisomas también contienen una pequeña cantidad de polipéptidos de enlace, los cuales pueden inducir la agregación de los trímeros de ficobiliproteínas y también pueden conectar el núcleo a la membrana tilacoidal (Zhao y Qin, 2006).

Además de las dos subunidades polipeptídicas α y β , las ficobiliproteínas contienen uno o mas cromóforos tetrapirroles lineales de cadena abierta como grupo prostético el cual está enlazado covalentemente a la proteína. Los cromóforos, conocidos como ficobilinas, se

enlazan a las ficobiliproteínas por uno u ocasionalmente dos enlaces tioéter unidos a un residuo de cisteína. Existen varias estructuras diferentes de cromóforos ficobilina con diferentes propiedades espectroscópicas, estos cromóforos son: ficourobilina, ficobiliviolina, ficoeritrobilina y ficocianobilina (Figura 2), mismos que poseen absorbancia máxima aproximadamente de 498 nm, 568 nm, 535 nm a 567 nm y 620 a 660 nm, respectivamente (Holzwarth *et al.*, 1983; Grossman *et al.*, 1993; Apt *et al.*, 1995). Los cromóforos actúan como captadores de luz visible en las ficobiliproteínas además de conferir un color característico: ficocianina (azul brillante), ficoeritrina (rojo) y aloficocianina (verde-azul) (Glazer, 1988; Santiago-Santos *et al.*, 2004).

La composición de las ficobiliproteínas en peso es de aprox. 96% de proteína y 4% de cromóforos (Thomas *et al.*, 1993). Las subunidades α y β de la ficocianina y la aloficocianina están enlazadas a ficocianobilina. Se han encontrado excepciones a esta generalidad en cianobacterias marinas, donde la subunidad α de la ficocianina puede estar asociada con un cromóforo de ficourobilina o ficoeritrobilina. La subunidad α de la ficocianina y la subunidad α y β de la aloficocianina están enlazadas a un cromóforo, mientras que la subunidad β de la ficocianina está unida a dos cromóforos. En muchas cianobacterias el cromóforo ficoeritrobilina está enlazado exclusivamente a α ficoeritrina y β ficoeritrina: dos moléculas de ficoeritrobilina están unidas a la subunidad α y tres están unidas a la subunidad β . En unas cuantas cianobacterias marinas los ficobilisomas contienen dos tipos diferentes de ficoeritrina y algunos sitios de unión de las subunidades de la ficoeritrina pueden estar ocupados por el cromóforo ficourobilina en lugar de la ficoeritrobilina. Además, la α ficoeritrina en estos organismos puede estar ligada a tres cromóforos en lugar de dos. En las algas rojas, tal como en cianobacterias marinas, las subunidades de ficoeritrina pueden contener ambos cromóforos ficoeritrobilina y ficourobilina. Dado que la máxima transmisión de luz en agua marina es cerca de 500 a 498 nm, el remplazo de ficoeritrobilina por ficourobilina en α ficoeritrina, el cual causa un cambio a azul en la máxima absorbancia de los ficobilisomas, puede incrementar la eficiencia con la cual la luz es capturada en un ambiente marino (Grossman *et al.*, 1993).

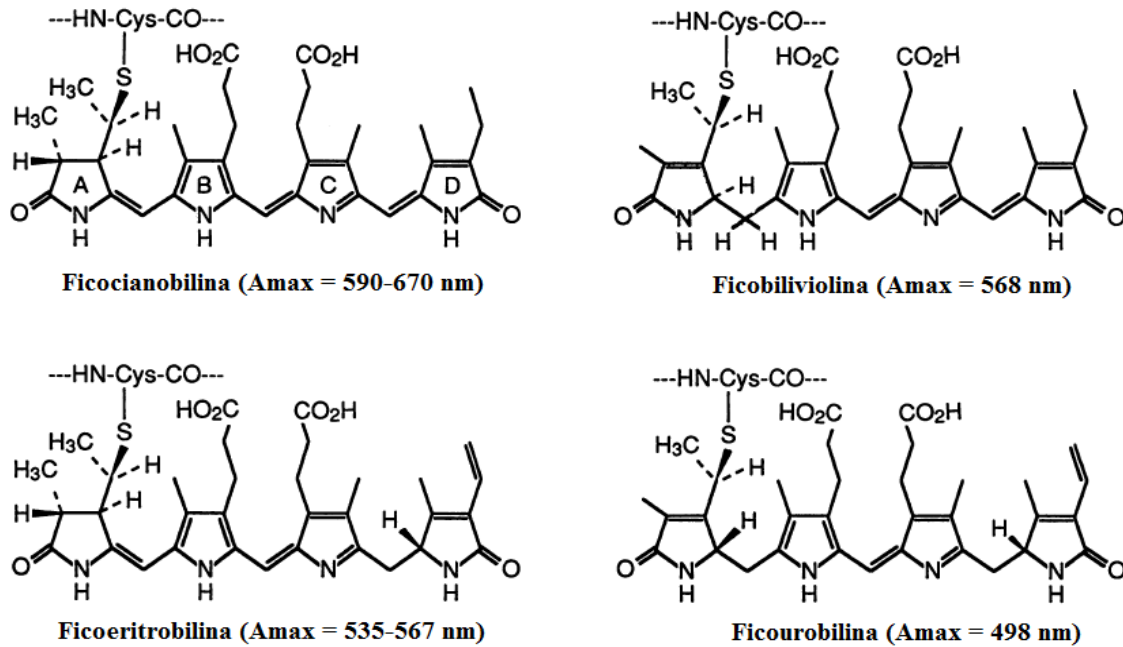
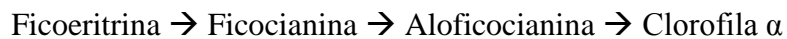


Figura 2. Ficobilinas y sus enlaces peptídicos en las ficobiliproteínas. Tomado de Grossman *et al.* (1993).

II.5. Función de las Ficobiliproteínas

Como se mencionó anteriormente, las ficobiliproteínas poseen la habilidad de absorber luz en la región visible del espectro gracias a la presencia de enlaces covalentes ligados a las ficobilinas. Contribuyen con el 30 a 50% de la capacidad de captación de luz (Hilditch, *et al.*, 1991). La vía de transferencia de la energía de luz atrapada por las ficobiliproteínas a la clorofila α posee una eficiencia mayor al 95% y sigue la siguiente secuencia (Grossman *et al.*, 1993; Glazer y Hixson, 1975; Padyana *et al.*, 2001; Zhao y Qin, 2006).



La transferencia secuencial de energía de la ficoeritrina a la ficocianina y aloficocianina, es eventualmente transferida a la clorofila. La energía de excitación de los cromóforos dentro de las proteínas difiere ligeramente debido a diferentes ambientes

microscópicos o ligeras diferencias estructurales. Por lo tanto, la energía transferida no es resonante en la naturaleza (Friedrich *et al.*, 1981). Debido a la cercanía y la fuerte superposición espectral de la energía transferida entre los diferentes cromóforos debe ser un proceso favorable (Holzwarth *et al.*, 1983).

II.6. Las Ficobiliproteínas como Almacenamiento de Compuestos de Nitrógeno

Las ficobiliproteínas no son esenciales para el funcionamiento de las células, ya que éstas pueden ser selectivamente degradadas cuando las células son expuestas a inanición de nitrógeno. Por lo tanto, las ficobiliproteínas poseen un papel secundario como el almacén de compuestos nitrogenados que son movilizados para otros propósitos en tiempos de escases de nitrógeno (Eriksen, 2008).

II.7. Generalidades de la Ficocianina

La ficocianina está compuesta por dos subunidades diferentes de proteína α y β de 17 000 y 19 500 Da, respectivamente, con un cromóforo bilina unido a la subunidad α (α 84) y dos a la subunidad β (β 84, β 155) (Romay *et al.*, 2003). Todas las ficocianinas que poseen solo el cromóforo de ficocianobilina, son nombradas como C-ficocianina. Han sido elucidadas las estructuras cristalográficas de la C-ficocianina de numerosas cianobacterias y rodofitas. Todas ellas han mostrado la misma organización de complejos de C-ficocianina con solo pequeñas variaciones dependiendo de la especie (Eriksen, 2008).

El espectro de absorción del monómero de ficocianina y todos los agregados exhiben una primera banda fuerte en el estado excitado a 615 nm y una banda mucho más débil en estado de excitación a 360 nm. Ambas bandas se deben a las propiedades del cromóforo bilina cuando la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de la proteína es desnaturalizada, la

absorción visible de la banda así como la fluorescencia decaerá en intensidad (Romay *et al.*, 2003).

La estructura química del cromóforo bilina en la ficocianina es muy similar a la bilirrubina, un producto hemo-degradativo. La bilirrubina es considerada como un importante antioxidante fisiológico contra las especies reactivas. Inhibe modificaciones oxidativas de proteínas del plasma y residuos de aminoácidos aromáticos. La compactación de los radicales de oxígeno por la bilirrubina ha demostrado proteger a la albúmina de suero así como a otros objetivos biológicos (Romay *et al.*, 2003).

La ficocianina representa una parte constitutiva de los ficobilisomas ya que siempre se encuentra presente en la unión entre el núcleo y el dominio rod del ficobilisoma (Ducret *et al.*, 1994).

II.8. Aplicaciones de las Ficobiliproteínas

II.8.1. Ingrediente Nutricional y Natural en Colorantes para Comida y Cosméticos

La coloración característica de las ficobiliproteínas las hace atractivas para su uso en la industria de comida y cosméticos como un pigmento natural. Entre las ficobiliproteínas, la ficocianina es el pigmento azul natural más importante de la industria de comida en los procesos de goma de mascar, paletas, dulces, refrescos, productos de leche y gelatinas; mientras que para cosméticos se utiliza en labiales y delineadores (Santiago-Santos *et al.*, 2004; Sekar y Chandramohan, 2008).

La ficocianina es uno de los principales pigmentos constituyentes de la *Spirulina*, una microalga usada en muchos países como suplemento dietético cuyo valor nutricional y terapéutico ha sido bien documentado (Romay *et al.*, 2003).

II.8.2. Marcador Fluorescente en Investigaciones Biomédicas

Debido a sus propiedades fluorescentes, las ficobiliproteínas pueden ser usadas como un biomarcador fluorescente con proteínas, anticuerpos y ácidos nucleicos para diagnosticar varias enfermedades letales y en diferentes kits de diagnóstico. La síntesis de conjugados de ficobiliproteínas con moléculas que tienen especificidad biológica, como las inmunoglobulinas, proteína A, biotina y avidina, han sido reportadas y han mostrado un amplio uso en la histoquímica, microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, clasificación de células por activación de fluorescencia e inmunoensayos de fluorescencia (Oi *et al.*, 1982; Sun y Wang, 2003).

En cuanto a estudios de citometría, las posiciones fortuitas de los espectros de las ficobiliproteínas en la longitud de onda de la región visible aumenta la utilidad de las ficobiliproteínas en los sistemas que utilizan láser como fuentes de excitación. El laser de ion argón es usualmente utilizado en los sistemas de citometría de flujo, emite a 488 nm donde la ficoeritrina absorbe fuertemente. El laser de helio-neón, emite a 633 nm, puede ofrecer ventajas técnicas adicionales de costo y confiabilidad y funciona bien para la excitación de la aloficocianina. Una nueva versión del laser helio-neón, emite a 543 nm, puede también volverse popular como una fuente de extinción de ficoeritrina (Kronick, 1986).

Los coeficientes de extinción de las ficobiliproteínas pueden ser tan grandes como $2.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, una 30 veces a la utilizada frecuentemente en marcador de fluorescencia, mientras que la eficiencia cuántica puede ser tan alta como 0.8, tan buena o mejor que los marcadores sintéticos convencionales. Este enorme coeficiente de extinción y la alta eficiencia cuántica pueden incrementar la sensibilidad en los ensayos de fluorescencia (Kronick, 1986).

La ficoeritrina es la ficobiliproteína más utilizada en pruebas fluorescentes, desde que fue aislada como hexámeros $\alpha_6\beta_6$ y su rendimiento cuántico de fluorescencia fue de 82-98 % (Oi *et al.*, 1982). La fluorescencia *in vivo* de la ficocianina ha sido usada para monitorear el crecimiento de cultivos de cianobacterias, detección de toxicidad de cianobacterias en agua potable y detección remota de cianobacterias en aguas naturales (Eriksen, 2008).

La C-ficocianina derivada de la *Spirulina platensis*, influye en las concentraciones de colesterol en el suero e imparte una fuerte actividad hipocolesterolémica (Merchants, 2010).

II.8.3. Propiedades farmacológicas

Las propiedades farmacológicas atribuidas a la ficocianina y otras ficobiliproteínas incluyen: actividad antioxidante, antiproliferativa, anti-inflamatoria, neuroprotectiva y hepatoprotectora (Eriksen, 2008).

II.8.3.1. Antioxidante

La actividad antioxidante y capacidad captadora de radicales libres de la C-ficocianina de diferentes cianobacterias está bien documentada (Padyana *et al.*, 2001; Romay *et al.*, 2003). Estas actividades son principalmente atribuidas a los grupos ficocianobilinas. McCarty (2007), propuso que la ficocianorubina, una forma reducida de la ficocianobilina, es la especie antioxidante importante *in vivo* basado en su similitud con la bilirrubina, un antioxidante natural en el plasma. La bilirrubina, además de la ficocianorubina puede inhibir la formación de radicales superóxido por la NADPH oxidasa, y puede, por lo tanto, jugar un papel protector adicional, reduciendo la generación de especies reactivas de oxígeno en el cuerpo.

Recientemente, se ha observado que la ficocianina posee ciertas propiedades terapéuticas como antioxidante. Provee 20 veces más actividad antioxidante que el ácido ascórbico, ha sido usada como un anti-inflamatorio y un hepatoprotector (Romay *et al.*, 2003; Santiago-Santos *et al.* 2004; Eriksen, 2008).

II.8.3.2. Antiproliferativos

Se ha reportado que la C-ficocianina (C-PC) proveniente de cianobacterias posee varias características farmacológicas, entre ellas la actividad anti-tumoral. Se han hecho estudios con la subunidad β de la C-PC, expresada en *Escherichia coli*, encontrando que la C-PC/ β

recombinante posee propiedades anti-cancerígenas. Bajo el tratamiento de 5 mM de la C-PC/ β , cuatro líneas diferentes de células cancerígenas acumularon una alta inhibición en la proliferación y se favoreció la inducción de la apoptosis. Sustancialmente, ocurrió una baja respuesta en células no cancerígenas. Se encontró que el mecanismo de acción de la C-PC/ β interactúa con la β -tubulina y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) asociadas a la membrana. En el tratamiento se observó que la C-PC/ β depolimeriza los microtúbulos y los filamentos de actina. Las células se someten a apoptosis con un incremento en la actividad de caspasa-3 y caspasa-8. Con un arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular. Además, se presentó un decremento significativo de GAPDH a nivel nuclear. El decremento de GAPDH previene la entrada en la fase S del ciclo celular. La inhibición de la proliferación de células de cáncer y la inducción de la apoptosis pueden potenciar a la C-PC/ β como un promotor preventivo de cáncer o agente terapéutico (Wang *et al.*, 2007).

Vargas-Rodríguez *et al.* (2006), evaluaron la actividad citotóxica de las ficobiliproteínas extraídas de *Pseudoanabaena* en dos líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaLo y HeLa) a 6 diferentes dosis de ficobiliproteínas (2.17×10^{-3} , 4.35×10^{-3} , 8.70×10^{-3} , 8.7×10^{-3} , 3.48×10^{-2} y 6.96×10^{-2} mg/ml), con dos tratamientos. En el primero únicamente exponiéndolas a las ficobiliproteínas y el otro con exposición simultánea a la irradiación con un láser de argón. Determinaron que para HeLa, las dos primeras dosis eran seguras, sin embargo, cuando las células se irradiaron se determinó un 46% de muerte celular en ambas dosis. En las dosis más altas la muerte fue de 48 al 57% en las células irradiadas, mientras que en la línea CaLo no se observó diferencia significativa en ambos tratamientos, mostrando alta mortalidad. Se concluyó que los extractos presentan actividad citotóxica por sí mismos, mientras que la terapia fotodinámica es efectiva para HeLa.

Otros estudios con ficocianina proveniente del alga verde-azul, *Spirulina*, demostraron actividad anti-carcinoma en células de carcinoma de Ehrlich Ascites (EACC), con una inhibición significativa dependiente de la dosis. Se observó que la ficocianina no indujo la fragmentación del ADN en EACC. Sin embargo, glutatión (GST), la actividad de la glutatión S-transferasa (GST) y la lactato deshidrogenasa (LDH) incrementaron de forma significativa sobre el nivel control. Esto indica que la ficocianina puede ser capaz de inhibir el crecimiento de EACC por la destrucción de la membrana, lo cual lleva al incremento de escape de los constituyentes celulares y el incremento de la actividad de las enzimas LDH y GST. Por lo

cual, la ficocianina de las algas puede tener actividad antitumoral y podría ser usado como un agente quimioterapéutico (Abd El-Baky, 2003).

En la Tabla II se resumen algunas de las aplicaciones potenciales para desarrollo de fármacos de ficocianina.

Sekar y Chandramohan (2008), han contado las patentes existentes sobre las ficobiliproteínas y han encontrado 55 patentes sobre la producción de ficobiliproteínas, 30 patentes en aplicaciones en la medicina, comida y otras áreas y 236 patentes sobre la aplicación en la utilización de las propiedades fluorescentes de las ficobiliproteínas. Al menos 11 compañías están actualmente produciendo y vendiendo ficobiliproteínas, derivados de ficobiliproteínas o aplicaciones de ficobiliproteínas.

En los últimos 10-15 años, se ha incrementado el interés en el uso potencial de la ficocianina en aplicaciones fluorescentes, nutraceuticas y farmacéuticas. La ficocianina ha sido estabilizada químicamente y por ingeniería de proteínas y nuevos procedimientos de purificación, ha sido posible obtener una ficocianina muy pura con alto rendimiento. Los efectos positivos en la salud han sido relacionados al consumo de ficocianina purificada. A pesar de que la mayoría de éstos siguen sin ser completamente comprendidos, el reconocimiento de las semejanzas funcionales entre ficocianorubina y la forma natural del antioxidante fisiológico bilirrubina, ha transformado a la ficocianina en un futuro candidato nutraceutico y farmacéutico. Exitosas aplicaciones nutraceuticas y farmacéuticas dependerán de la producción de ficocianina bajo condiciones bien controladas (Eriksen, 2008).

Tabla II. Potenciales farmacéuticos de la ficocianina, los mecanismos fisiológicos sugeridos responsables de los efectos y los sistemas experimentales. Tomada de Eriksen (2008).

POTENCIALES FARMACÉUTICOS Y MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE LA FICOCIANINA	SISTEMA EXPERIMENTAL	REFERENCIA
<u>Actividad antioxidante y captadora de radicales</u>		
Anti-inflamatorio, previene edemas de glucosa oxidasa-inducidos	Ratones, <i>in vivo</i>	Romay <i>et al.</i> (1998)
Anti-inflamatorio, reduce la colitis de ácido acético-inducido, capturador de radicales de oxígeno	Ratas, <i>in vivo</i>	González <i>et al.</i> (2007)
Previene arterioesclerosis por colesterol-inducido, aumentando los efectos antioxidantes en las lipoproteínas de plasma	Hamster, <i>in vivo</i>	Riss <i>et al.</i> (2007)
Previene daño neuronal por ácido Kaínico inducido, capturando radicales de oxígeno	Ratas, <i>in vivo</i>	Rimbau <i>et al.</i> (1999)
Previene la formación de piedras en el riñón por el ácido oxálico inducido, previene la peroxidación de lípidos	Ratas <i>in vivo</i>	Farooq <i>et al.</i> (2004)
Previene la encefalopatía hepática por tioacetamida-inducida, previene la peroxidación de lípidos	Ratas <i>in vivo</i>	Sathyaikumar <i>et al.</i> (2007)
Reduce la cardiotoxicidad de las drogas doxorubicina, capturando los radicales de oxígeno	Cardiomiocitos de ratas	Kahn <i>et al.</i> (2006)
<u>Efectos en la expresión de genes o inhibición de enzimas</u>		
Anti-inflamatorio, reprime la expresión de la óxido nítrico sintasa y reduce la síntesis de nitrito	Línea celular de macrófagos	Chemg <i>et al.</i> (2007)
Anti-agregación de plaquetas, predominantemente debido a la inhibición de ciclooxigenasa	Plasma de conejo	Chiu <i>et al.</i> (2006)
Anti-cancerogénico, induce la apoptosis en células humanas de carcinoma hepatocelular	Células de carcinoma hepatocelular	Roy <i>et al.</i> (2007)
Anti-cancerogénico, inhibe la proliferación de células humanas de leucemia mieloide	Células de leucemia mielógena	Liu <i>et al.</i> (2000)
Anti-cancerogénico, induce la apoptosis de células humanas de leucemia mieloide	Células de leucemia mielógena	Subhashini <i>et al.</i> (2004)

II.9. Extracción y Purificación de Ficocianina

La ficocianina puede ser extraída de cianobacterias y microalgas por diferentes procedimientos, los cuales combinan rompimiento de paredes celulares y extracción de ficobiliproteínas solubles en agua dentro de medios acuosos (Eriksen, 2008). Las ficobiliproteínas puras a partir de extractos crudos de alga son usualmente obtenidas por una combinación de diferentes métodos cromatográficos y precipitación con sulfato de amonio. En la Figura 3 se muestra un esquema general del proceso de extracción y purificación de ficobiliproteínas (Tchernov *et al.*, 1999).

Existen diversos métodos físicos y químicos para la ruptura celular y extracción de proteínas. La sonicación en un baño de agua de ultrasonido es una de las formas más sencillas de promover el rompimiento celular y ha sido comúnmente usada con *Porphyridium cruentum* y *Synechococcus*. La ruptura celular por prensa francesa se basa en la fuerza para tratar las muestras como si fueran exprimidas por un millón de orificios por la presión, lo cual destruye las células. Repetidos ciclos de congelación y descongelación de muestras en nitrógeno líquido pueden ayudar al proceso de ruptura celular. Además, moliendo la muestra en un molidor de tejidos resultará en el rompimiento celular (Sekar y Chandramohan, 2008).

Silveira *et al.* (2007), extrajeron ficocianina a partir de la cianobacteria, *Spirulina platensis*, evaluando los efectos de temperatura y proporción de biomasa-solvente en la concentración de ficocianina y la pureza del extracto, para determinar las condiciones óptimas para la extracción de ficocianina. Encontraron que las condiciones para la extracción de ficocianina de *S. platensis* fueron más altas en una proporción de biomasa- solvente de 0.08 g/ml a 25°C. Bajo dichas condiciones obtuvieron un extracto de ficocianina con concentración de 3.68 mg/ml y una pureza de 0.46.

A partir de biomasa húmeda, ha sido extraída C-ficocianina sometiendo la biomasa a ciclos de congelación de -25 a -15°C o en nitrógeno líquido, y descongelando de 4 a 30 °C (Abalde, *et al.*, 1998; Minkova *et al.*, 2003). Los ciclos de congelar/descongelar han sido la forma más eficiente de extraer C-ficocianina a partir de biomasa húmeda de cianobacteria (Abalde *et al.*, 1998). La C-ficocianina también ha sido extraída después de ruptura celular mecánica (Patel *et al.*, 2005), exposición a altas presiones (Gardner *et al.*, 1980), sonicación (Abalde *et al.*, 1998)

y tratamiento con lisozimas (Gardner *et al.*, 1980). También ha sido demostrado que *Klebsiella pneumonia* viva es efectiva en lisar *A. platensis* y extraer C-ficocianina en 24 h (Zhu *et al.*, 2007).

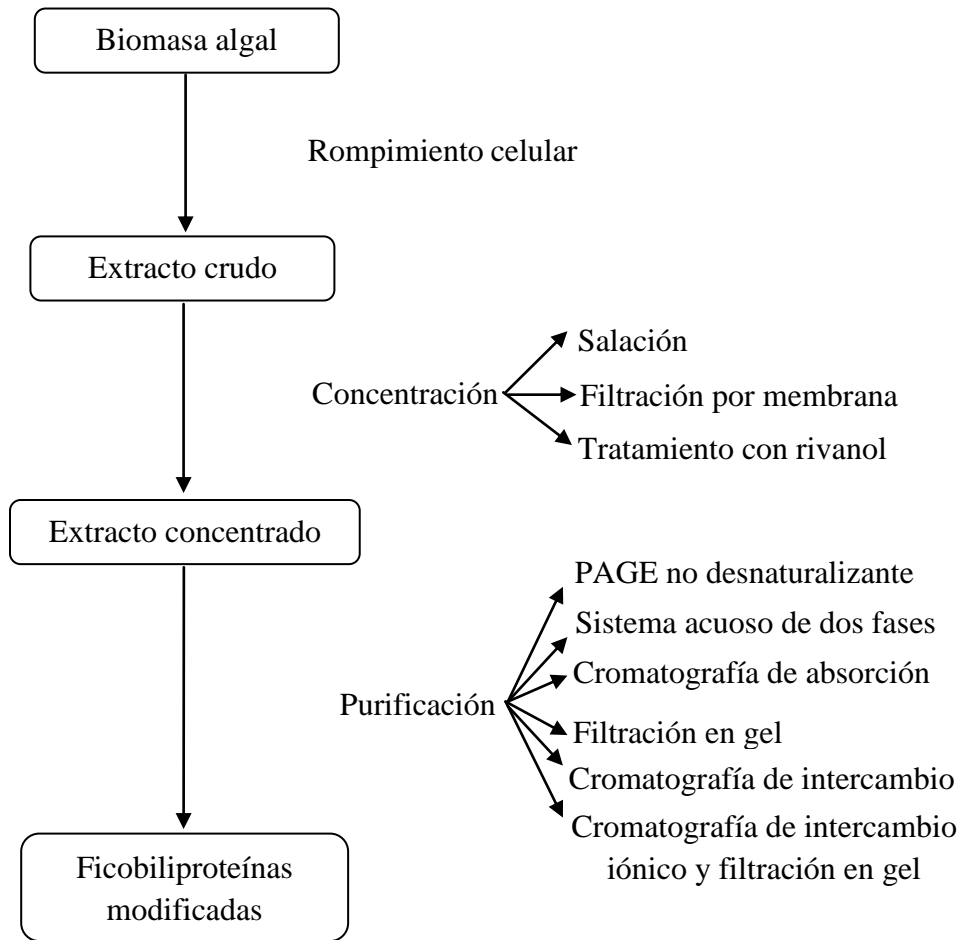


Figura 3. Extracción y purificación de ficobiliproteínas. Tomado de Prasanna *et al.* (2007).

II.10. Cromatografía

Eisele *et al.* (2000), purificaron C-ficocianina a partir del alga roja, *Cyanidium caldarium*, un alga que crece a temperaturas arriba de los 57°C y a un pH debajo de 0.05. Se estudiaron los efectos de la temperatura sobre la estabilidad de la proteína a través de dicróismo circular y espectroscopia de absorción. La proteína no presentó cambios de 10 a 50°C, lo cual indicó que el aumento de temperaturas no es necesario para causar que la proteína este fotosintéticamente activa. A 60 y 65°, temperaturas arriba de las cuales el alga puede sobrevivir, la proteína se desnaturaliza de forma irreversible. La cromatografía de filtración en gel demostró que la irreversibilidad es causada por la disociación de la proteína trimérica a sus polipéptidos constitutivos. Al enfriarse, los polipéptidos α y β no volvieron a formar el trímero.

Minkova *et al.* (2003), purificaron C-ficocianina de *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*, por un tratamiento de pasos múltiples del extracto crudo con rivanol en un radio 10:1 (v/v), seguido por 40% de saturación con sulfato de amonio. Después de remover el rivanol con filtración en gel de Sephadex G-25, la solución de pigmento fue saturada con 70% de sulfato de amonio. Después del último paso de purificación, C-ficocianina tuvo una emisión y absorción máxima a 620 y 650 nm, respectivamente y un radio de absorbancia A_{620}/A_{280} de 4.3, el cual es específico de las biliproteínas puras. Su homogeneidad fue demostrada por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio, produciendo dos bandas de peso molecular de 19 500 y 21 500 kDa, correspondientes a las subunidades α y β de los pigmentos, respectivamente. La producción de C-ficocianina fue de aprox. 46% de su contenido en el extracto crudo.

Santiago-Santos *et al.* (2004), extrajeron y purificaron ficocianina a partir de *Calothrix* sp., una cianobacteria aislada de campos de arroz en Cuernavaca, Morelos, México. La ficocianina se extrajo con 2 mg de lisozimas/g biomasa húmeda y purificada por cromatografía aniónica usando una columna de Q-Sepharose de flujo rápido y cromatografía de interacciones hidrofóbicas con una columna con grupos metilo como matriz. La proteína purificada mostró un pI (punto isoelectrico) de 5.2 y tuvo dos subunidades con peso molecular aparente de 21-17 kDa cada una. El peso molecular estimado de la ficocianina nativa purificada fue de 114 kDa, sugiriendo una estereoquímica de $(\alpha\beta)_3$.

Patel *et al.* (2005), describieron un método cromatográfico eficiente para la purificación de C-ficocianina a partir de tres especies de cianobacterias, *Spirulina* sp. (de agua dulce), *Phormidium* sp. (agua marina) y *Lyngbya* sp. (agua marina). La purificación de C-ficocianina se realizó por un tratamiento de pasos múltiples del extracto crudo por precipitación fraccional con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de intercambio aniónico en la columna DEAE-Sepharose CL-6B. Se obtuvieron C-ficocianina de *Spirulina* sp., *Phormidium* sp. y *Lyngbya* sp. con radios de pureza (A_{620}/A_{280}) 4.42, 4.43 y 4.59, respectivamente, la pureza y homogeneidad fueron confirmadas mediante electroforesis en poliacrilamida de forma nativa y SDS-PAGE. Los pesos moleculares estimados para la C-ficocianina de *Spirulina*, *Phormidium* y *Lyngbya* fueron de 112, 131 y 81 kDa, respectivamente. SDS-PAGE de C-ficocianina pura mostró dos bandas correspondientes a las subunidades α y β . Los resultados de SDS-PAGE demostraron el mismo peso molecular de la subunidad β (24.4 kDa) para las tres especies de cianobacterias, mientras que el peso molecular de la subunidad α fue diferente para todas (17 kDa *Spirulina* sp., 19.1 kDa *Phormidium* sp. y 15.2 kDa *Lyngbya* sp.).

C-ficocianina pura ha sido obtenida principalmente de *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* por la combinación de precipitación con sulfato de amonio y diferentes métodos cromatográficos (Minkova *et al.*, 2003). Sin embargo, un procedimiento de purificación que funcione bien para una ficobiliproteína de un organismo puede no ser el método de elección para la proteína correspondiente de otro organismo (Glazer, 1988).

La Tabla III enlista una serie de procedimientos que han sido usados para la purificación de ficocianina a partir de extractos celulares. La precipitación con sulfato de amonio combinada con una variedad de principios cromatográficos han sido empleados para obtener ficocianina con grado alimenticio, reactivo y analítico (Eriksen, 2008).

Tabla III. Procedimientos usados para la purificación de ficocianina con pureza final. Tomado de Eriksen (2008). ^aCentrifugación, diálisis y filtración no son incluidas

NÚMERO Y TIPOS DE OPERACIONES ^a	ESPECIES	PUREZA (A ₆₂₀ /A ₂₈₀)	REFERENCIA
MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS			
1. Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2. Cromatografía de intercambio iónico.	<i>Spirulina</i> sp.	4.42	Patel <i>et al.</i> , 2005
1. Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2. Cromatografía de intercambio iónico.	<i>Phormidium</i> sp.	4.43	Patel <i>et al.</i> , 2005
1. Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2. Cromatografía de intercambio iónico.	<i>Lyngbya</i> sp.	4.59	Patel <i>et al.</i> , 2005
1. Tratamiento con rivanol, 2. Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ , 3. Filtración en gel, 4. Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄	<i>S. fusiformis</i>	4.30	Minkova <i>et al.</i> , 2003
1. Cromatografía con cama expandida de adsorción, 2. Cromatografía de intercambio aniónico	<i>S. platensis</i>	3.64	Niu <i>et al.</i> , 2007
1. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas, 2. Cromatografía de intercambio iónico	<i>Synechococcus</i> sp.	4.85	Abalde <i>et al.</i> , 1998
1. Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2. Cromatografía de exclusión por tamaño, 3. Cromatografía de intercambio aniónico	<i>O. quadripunctulata</i>	3.31	Soni <i>et al.</i> , 2006
1. Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2. Cromatografía con hidroxiapatita (interacciones electrostáticas)	<i>A. flosaquae</i>	4.78	Benedetti <i>et al.</i> , 2006
1. Fraccionamiento con (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas	<i>P. fragile</i>	4.52	Soni y Trivedi, 2008
1. Fraccionamiento con (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2. Cromatografía de intercambio iónico, 3. Filtración en gel.	<i>Aphanothece halophytica</i>	4.8	Hilditch <i>et al.</i> , 1991
1. Tratamiento con lisozimas, 2. Cromatografía de intercambio iónico, 3. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas	<i>Calothrix</i> sp.	3.5	Santiago-Santos <i>et al.</i> , 2004
1. Adsorción con quitosano, 2. Extracción con dos fases acuosas combinado con extracción con dos fases acuosas y métodos cromatográficos	<i>S. platensis</i>	5.1	Patil <i>et al.</i> , 2006

II.11 .Pureza

En numerosas publicaciones el criterio usado para determinar la pureza de preparaciones de ficocianina está basado en la proporción entre absorbancia de las ficocianobilinas a 620 nm, A_{620} y aminoácidos aromáticos en todas las proteínas en la preparación a 280 nm, A_{280} . Las preparaciones de C-ficocianina con A_{620}/A_{280} mayores que 0.7 fueron considerados de calidad alimentaria por Rito-Palomares *et al.* (2001), mientras que A_{620}/A_{280} de 3.9 fueron considerados de grado reactivo y A_{620}/A_{280} mayores que 4.0 de grado analítico (Eriksen, 2008).

II.12. *Rhodorus marinus* como Fuente de Ficobiliproteínas

Las algas y sus derivados se están produciendo comercialmente a nivel mundial, sobresaliendo los géneros *Dunaliella*, *Spirulina*, *Porphyridium*, *Botryococcus*, *Isochrysis*, *Chlorella* y *Hematococcus*. Sin embargo, se estima que sólo un 10% de las especies existentes han sido estudiadas, con la finalidad de conocer su fisiología y potencialidad (Molina *et al.*, 2007; Sawraj *et al.*, 2005).

Entre las microalgas de interés como productoras de ficobiliproteínas y de exopolisacáridos se encuentra la microalga roja *Rhodorus marinus*, de tipo cosmopolita, unicelular que mide entre 4.5 y 11.5 μm de diámetro. A partir de esta microalga se han descrito estudios sobre fotosíntesis, agregación de célula-exopolisacáridos, reología del cultivo, purificación, caracterización y evaluación de actividad antiproliferativa *in vitro* de B-ficoeritrina (Enríquez-Guevara, 2006; Molina *et al.*, 2007; Básaca-Loya *et al.*, 2009; Rascón-Durán, 2009).

Básaca-Loya *et al.* (2009), reportó la purificación de B-ficoeritrina de la microalga roja, *Rhodorus marinus*, mediante la fragmentación manual y sonicación de las células, con la purificación mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión por tamaño e intercambio aniónico, así como por cromatografía líquida de alta resolución por medio de la cual obtuvieron ficoeritrina con pureza de 4.8.

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente no se tienen reportes de investigación sobre purificación de ficocianina a partir de su obtención de la microalga *Rhodospira rubra*. Debido a la importancia biotecnológica de la ficocianina por la alta demanda de este compuesto puro en el mercado lo cual hace atractivo desarrollar tecnologías para su purificación y con base en los estudios de la microalga *R. rubra* en el laboratorio, así como su rápido y fácil crecimiento bajo condiciones de laboratorio, en el presente trabajo se pretende purificar la ficocianina obtenida a partir de la microalga roja, *R. rubra*, a través de precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio aniónico y HPLC.

IV. HIPOTESIS

Aplicando los métodos básicos de purificación de ficobiliproteínas será posible purificar la ficocianina con alto grado de pureza obtenida a partir de la microalga roja *Rhodosorus marinus*. Debido a que estudios previos del espectro UV-visible de extractos de la microalga roja mencionada muestran la presencia de ficocianina y los métodos de purificación aplicados son usualmente utilizados para la purificación de la misma proteína en otros organismos.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

Purificar ficocianina obtenida a partir de la microalga roja *Rhodorus marinus*.

V.2. Objetivos Específicos

- a) Cultivar la microalga *Rhodorus marinus*.
- b) Extraer la ficocianina de la biomasa del alga roja *Rhodorus marinus*.
- c) Purificar la ficocianina a un grado de pureza analítico (pureza >4).
- d) Caracterizar la ficocianina mediante electroforesis y espectro UV-visible

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Cultivo de *Rhodorus marinus*

La microalga roja, *Rhodorus marinus* (UTEX 1723), fue obtenida de la colección de algas de la Universidad de Texas. El cultivo se realizó en base a las especificaciones descritas por Básaca-Loya (2009).

VI.1.1. Preparación del Material para Cultivo

El cultivo se llevó a cabo en garrafrones de cristal con 12 L de agua de mar con un rango de salinidad de 35 - 38. La esterilización de los garrafrones junto con los 12 L de agua de mar se realizó añadiendo 1.5 ml de hipoclorito de sodio al 5% (blanqueador comercial) y se dejó durante 12 horas a temperatura ambiente con aeración y agitación constante, para lo cual se utilizaron bombas de aire. Posteriormente se agregó 1.5 ml de tiosulfato de sodio (150mg/ml) y se mantuvo durante 12 horas bajo las condiciones anteriormente descritas, al finalizar se agregó el medio de cultivo (Básaca-Loya, 2009).

VI.1.2. Medio de Cultivo

Se utilizó el medio Erdschreiber (Rosowski y Parker, 1971), para el crecimiento de la microalga, *R. marinus*. La composición del medio se describe en la Tabla IV. El volumen de cada constituyente se preparó en base a 12 L de agua de mar.

VI.1.3. Método de Cultivo

El cultivo inicial de la microalga se realizó en tubos de ensaye de 10 ml, los cuales fueron posteriormente transferidos a matraces de 250 ml y finalmente a garrafones de cristal con un volumen de 12 L de agua de mar. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 19.8° (+/- 5°) con iluminación constante utilizando lámparas de luz blanca fluorescente de 40 watts. Para asegurar la oxigenación y agitación constante del medio, los recipientes fueron conectados a bombas de aire con filtros para evitar su contaminación.

Tabla IV. Composición del medio Erdschreiber.

CONSTITUYENTES	FÓRMULA	CONCENTRACIÓN
Nutrientes Mayores		g/10 ml de agua destilada
Nitrato de sodio	NaNO ₃	0.2
Fosfato de sodio monobásico	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.03
Solución de Metales Traza		mg/1000 ml de agua destilada
Cloruro férrico	FeCl ₃ .6H ₂ O	97
Cloruro manganoso	MnCl ₂ .4H ₂ O	41
Cloruro de zinc	ZnCl ₂	5
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	2
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	4
Solución de Vitamina		mg/100 ml de agua destilada
Tiamina	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS	20
Biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	1
Cianocobalamina (B ₁₂)	C ₆₃ H ₈₆ CoN ₁₄ P	10

VI.2. Obtención de Biomasa

Para la obtención de biomasa de *R. marinus*, el cultivo se dejó reposar unas horas (aproximadamente 5 horas) hasta lograr la sedimentación celular. Posteriormente, se eliminó la mayor cantidad de sobrenadante por decantación y se centrifugó el sedimento obtenido para eliminar el agua restante. La centrifugación se realizó a 1157 g (3000 r.p.m.) (EppendorfTM, modelo 5804R) durante 5 minutos a 4°C. La biomasa obtenida se congeló alrededor de 15 minutos a -20°C para su posterior liofilización, (Freezone 6 Plus de LabconcoTM). A partir de la biomasa liofilizada se llevó a cabo la extracción y purificación de ficocianina.

VI.3. Extracción y Purificación de Ficocianina

VI.3.1. Extracción y Precipitación de Proteínas

Para la extracción de proteínas de *R. marinus*, se siguió la metodología descrita por Básaca-Loya (2009). Se pesaron 4 gramos de biomasa liofilizada de microalga, la cual fue resuspendida en 180 ml buffer de fosfatos/NaCl (0.010 M de Na₂HPO₄, 0.1 M NaCl, pH 7.0) previamente refrigerado. La suspensión se depositó en un mortero y se colocó en refrigeración a -20°C durante aprox. 20 min hasta punto de hielo. Posteriormente se realizó el fraccionamiento celular en el mortero durante 5 minutos, al finalizar, la muestra fue transferida a un vaso de precipitado para sonicar en frío durante 30 min. El vaso de precipitado se mantuvo envuelto en papel aluminio para reducir, en lo posible, la exposición de las proteínas a la luz. Después de la sonicación, la muestra se centrifugó a 3214 g (5000 r.p.m.) a 4°C por 10 minutos, el precipitado se descartó y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman con poro de 1µm.

La precipitación de proteínas se realizó mediante una saturación doble con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄). La primera saturación fue al 40% con sulfato de amonio el cual se

agregó al sobrenadante filtrado, se mantuvo en agitación constante a 4°C durante 3 horas. Transcurrido el tiempo, la muestra se centrifugó a 1157 g (3000 r.p.m) a 4°C durante 10 minutos. Se descartó el precipitado y al sobrenadante obtenido se le realizó una segunda saturación al 60% con sulfato de amonio, se dejó en agitación constante a 4°C durante 12 horas. Nuevamente la muestra se centrifugó bajo las condiciones anteriormente descritas, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 30 ml de buffer de fosfatos.

VI.3.2. Cromatografía de Filtración en Gel

La muestra obtenida de la precipitación de proteínas con sal fue desalada a partir de una cromatografía de exclusión por tamaño. Se utilizó una columna de 17.5 cm de altura y 2.5 cm de diámetro empaquetada con una matriz de Sephadex G-25 (SIGMA), hidratada con un buffer de fosfato (0.010 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.1 M de NaCl a pH 7.0). La recolección de fracciones se realizó con un flujo constante de 1 ml/min. Colectando 3 ml por fracción (tubo). Se mantuvo un flujo constante controlado por un sistema de bomba peristáltica de flujo variable (modelo 3389, VWRTM) conectada a la columna. Las fracciones colectadas fueron analizadas con espectrofotómetro UV/VIS y aquellas que presentaron absorbancia a 280 nm se juntaron en un pool, el cual se aplicó a la cromatografía de intercambio aniónico.

VI.3.3. Cromatografía de Intercambio Aniónico

Para realizar la cromatografía de intercambio aniónico se empleó una columna pre-empacada de Intercambio Aniónico en Q-Sepharosa (HiPrepTM 16/10 Q XL), equilibrada con buffer de fosfatos (0.010 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.1 M de NaCl a pH 7.0). Para la elución de las fracciones se usaron tres buffers con diferente fuerza iónica: 1) 0.010 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.1 M de NaCl; 2) 0.010 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.25 M de NaCl; y 3) 0.010 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.5 M de NaCl. Se agregaron 10 ml de muestra proveniente de la

cromatografía de exclusión por tamaño, previamente filtrada en filtro de fibra de vidrio Whatman (poro de 1 μm). Para separar las diferentes fracciones se aplicaron 40 ml de cada buffer en el orden descrito (de menor a mayor fuerza iónica). Se colectaron fracciones de 3 ml con un flujo constante de 1ml/min. Las fracciones fueron analizadas por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 280, 545, 615 y 652 nm, longitudes de onda a las cuales absorben las proteínas, ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina, respectivamente. Las fracciones que presentaron ficocianina con grado de pureza mayor a 3 (pureza grado reactivo según Eriksen, 2008) fueron mezcladas en un pool etiquetado como “Fracción 1”, las fracciones con pureza de 2 a 3 como “Fracción 2” y las fracciones con pureza de 1 a 2 “Fracción 3”, dichas fracciones fueron posteriormente aplicadas en la cromatografía líquida de alta resolución.

VI.3.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Los pool de fracciones de ficocianina con diferente grado de pureza fueron sometidos al sistema (Agilent serie 1100) de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés), en una columna Zorbax GF-250 (0.94 x 25 cm, AgilentTM), la cual fue pre-equilibrada con buffer de fosfatos (0.010 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.1 M de NaCl a pH 7.0). La muestra se filtró por una membrana de poro de 0.2 μm , previo a su inyección en un loop de 2 ml. La elución de la muestra se llevó a cabo durante 30 minutos, usando el mismo buffer de fosfatos con un flujo constante de 0.5 ml/min y colectando fracciones de 1.5 ml por tubo. Las fracciones fueron analizadas por espectrofotometría.

VI.4. Caracterización de Ficocianina

VI.4.1. Determinación de Pureza

La pureza de los extractos de ficocianina fue monitoreada espectrofotométricamente durante los diferentes pasos de extracción y purificación, comparando la absorción máxima de la ficocianina (A_{615}) con la de todas las proteínas (A_{280}) es decir, la proporción de A_{615}/A_{280} (Abalde *et al.*, 1998). $A_{615}/A_{280} = \text{Pureza de Ficocianina}$.

Las fracciones con $A_{615}/A_{280} > 4$ fueron consideradas como fracciones con contenido de ficocianina pura de grado analítico según lo establecido por Eriksen (2008).

VI.4.2. Concentración de Ficocianina

La concentración de ficocianina (PC) fue monitoreada en los diferentes pasos de extracción y purificación. La concentración fue calculada por espectrofotometría de absorción a 652 y 615 nm, longitudes en las cuales absorben la aloficocianina y ficocianina, respectivamente, aplicando la ecuación descrita por Abalde *et al.* (1998).

$$\text{PC (mg/ml)} = \frac{(A_{615} - 0.474 (A_{652}))}{5.34}$$

VI.4.3. Determinación de Peso molecular por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

Para la determinación del peso molecular de la ficocianina, se realizó Electroforesis vertical en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés). El

gel de poliacrilamida se preparó al 16.5 % (p/v) de 1.0 mm de grosor. La electroforesis se realizó en condiciones reductoras y desnaturalizantes utilizando dodecil sulfato de sodio al 0.1% (p/v) y 2-Mercaptoetanol, a temperatura ambiente. Para la visualización de los geles se aplicó la tinción de azul de coomassie y para calibración se usaron estándares de masa molecular de proteínas (SIGMA).

VII. RESULTADOS

VII.1. Cultivo de *Rhodorus marinus*

VII.1.1. Obtención de Biomasa

El cultivo de la microalga, *R. marinus*, tuvo una duración aproximada de un mes y se obtuvo una producción de 5 g de biomasa liofilizada por cada 12 L de cultivo.

VII.2. Purificación de Ficocianina

VII.2.1. Extracción y Precipitación de Proteínas

Se obtuvo el extracto crudo a partir de 4 g de biomasa liofilizada de *R. marinus* resuspendida inicialmente en 180 ml de buffer de fosfato/NaCl. Posterior a la fragmentación celular, sonicación y centrifugación descritas en la metodología, se obtuvieron 142 ml de extracto crudo con el cual se realizó la precipitación de proteínas saturando con sulfato de amonio al 40 %, se determinó la pureza y concentración de ficocianina por medio de espectrofotometría (Figura 4). Se obtuvo una pureza de ficocianina de 1.18 y una concentración de 0.0535 mg/ml de ficocianina en un volumen total de 142 ml. Posterior a la segunda saturación con sulfato de amonio al 60 %, se resuspendió el precipitado en 30 ml de buffer de fosfato y se aplicó un barrido espectral (Figura 5) para determinar la pureza y concentración de ficocianina, dando como resultado 1.50 de pureza y 0.0577 mg/ml de ficocianina en un volumen total de 30 ml.

El espectro de absorción del extracto crudo de *R. marinus*, posterior a la precipitación de proteínas con sulfato de amonio al 40% mostró picos máximos a 570 y 619 nm

(absorbancia de 0.522 y 0.479, respectivamente), longitudes cercanas a las cuales absorben la ficoeritrina y ficocianina (545 y 615 nm, respectivamente) (Figura 4).

En la figura 5, se observa el espectro de absorción de la muestra de *R. marinus*, posterior a la precipitación de proteínas con sulfato de amonio al 60%. Se observa un pico máximo alrededor de los 625 nm, longitud cercana a la cual absorbe la ficocianina (615 nm) lo cual indica una mayor cantidad de dicha proteína comparada con la precipitación anterior (sulfato de amonio al 40%).

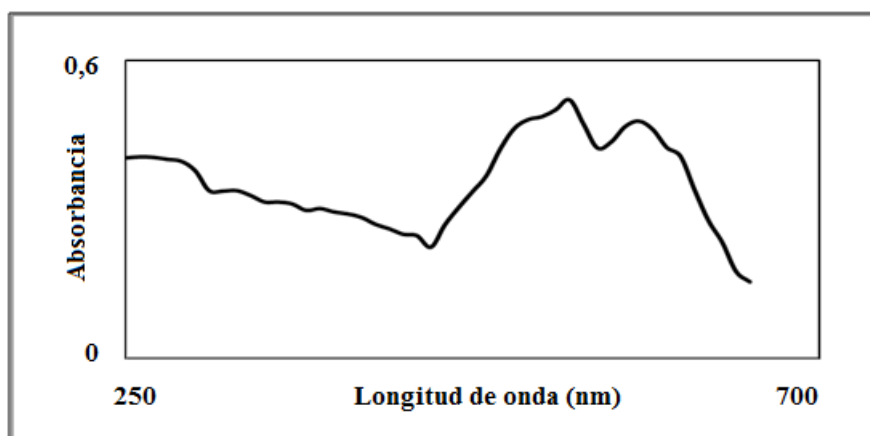


Figura 4. Barrido espectral del extracto crudo de *R. marinus*, posterior a la precipitación de proteínas con sulfato de amonio (40% de saturación).

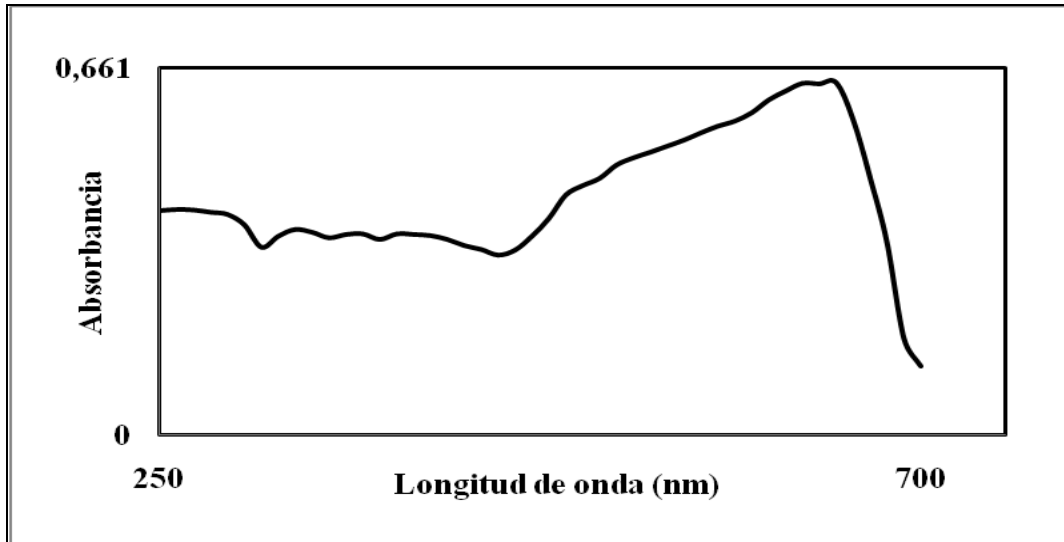


Figura 5. Barrido espectral del extracto crudo de *R. marinus*, posterior a la precipitación de proteínas con sulfato de amonio (60% de saturación).

VII.2.2. Cromatografía de Filtración en Gel

El precipitado obtenido por la saturación con sulfato de amonio al 60% y resuspendido en 30 ml de buffer de fosfatos, se aplicó en la cromatografía de filtración en gel con Sephadex G-25, obteniendo fracciones de 3 ml c/u. Se determinó la absorbancia a 280 nm para localizar las fracciones que contenían proteína (Figura 6). Se formó un pool con dichas fracciones (fracciones 11 a la 16). Se realizó un barrido espectral al pool de fracciones con el cual se determinó la pureza y concentración de ficocianina en 1.48 y 0.0653 mg/ml, respectivamente. Posteriormente el pool de fracciones se aplicó a la cromatografía de intercambio aniónico (Figura 7).

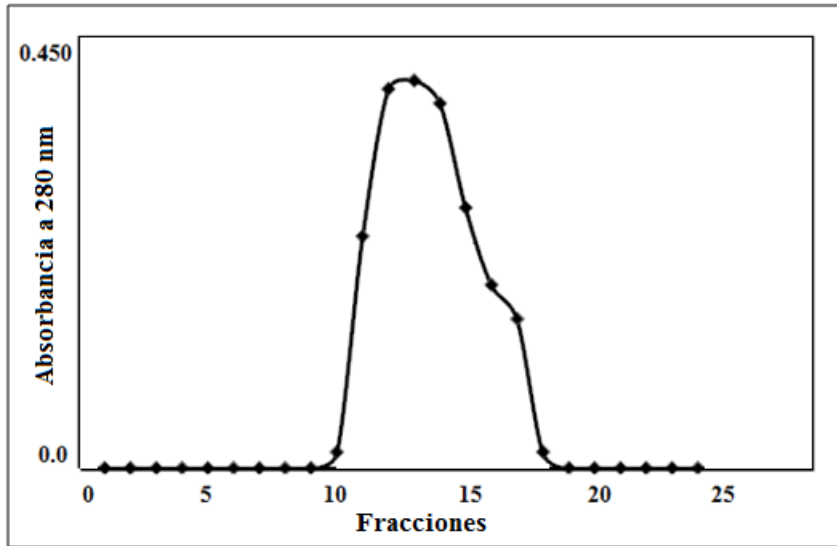


Figura 6. Gráfica de absorbanza a 280 nm de las fracciones obtenidas a partir de Sephadex G-25. Se observa que las fracciones 11 a la 16 presentan absorbanza a los 280 nm, característico de las proteínas.

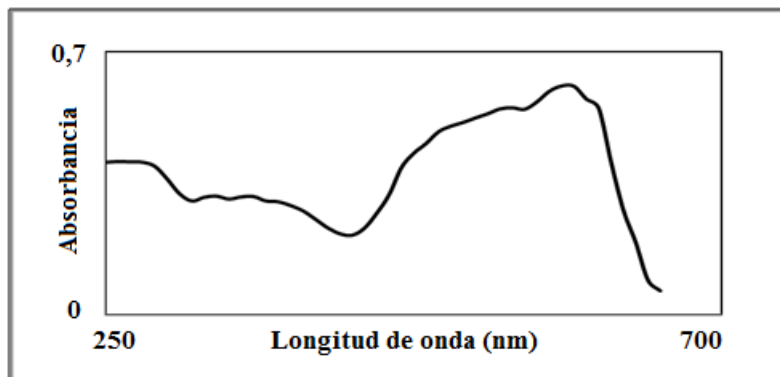


Figura 7. Barrido espectral de pool de fracciones con proteína obtenido a partir de Sephadex G-25. Se observa un pico alrededor de los 625 nm, característicos de ficocianina.

VII.2.3. Cromatografía de Intercambio Aniónico

Los resultados muestran que un gradiente de fuerza iónica discontinuo con diferentes concentraciones de NaCl en fosfato de sodio 0.01 M (pH 7.0) fue eficiente para la separación de ficocianina del resto de las ficobiliproteínas. La elución por intercambio aniónico se realizó

a concentraciones de 0.1, 0.25 y 0.5 M de NaCl. La ficocianina eluyó usando la concentración de 0.1 M de NaCl, mientras que la aloficocianina y la ficoeritrina se obtuvieron aplicando la concentración de 0.25 y 0.5 M de NaCl. Se obtuvieron fracciones de 3 ml c/u, realizando lecturas de absorbancia a 280 nm para determinar la presencia de proteínas y a 545, 615 y 650 nm para localizar fracciones que contenían ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina, respectivamente (Figura 8).

Aplicando la ecuación de Abalde *et al.* (1998), se determinó la pureza de ficocianina en cada fracción, las fracciones con $A_{615}/A_{280} > 3$ se juntaron en un pool denominado “Fracción 1”, fracciones de $A_{615}/A_{280} > 2 < 3$ se mezclaron en la “Fracción 2” y fracciones con $A_{615}/A_{280} > 1 < 2$ formaron la “Fracción 3”. A las fracciones anteriores se les realizó un barrido espectral (Figura 9) y se determinó su pureza y concentración de ficocianina.

En los espectros para las fracciones 1, 2 y 3 de ficocianina obtenidos a partir de *R. marinus*, se observa el pico característico de ficocianina a los 615 nm y un pico a los 280 nm de las proteínas. La pureza y concentración de ficocianina en las fracciones 1, 2 y 3 fue de 3.38, 2.61 y 1.62 de pureza, respectivamente, mientras que la concentración fue de 0.0408, 0.0478 y 0.0194 mg/ml, respectivamente.

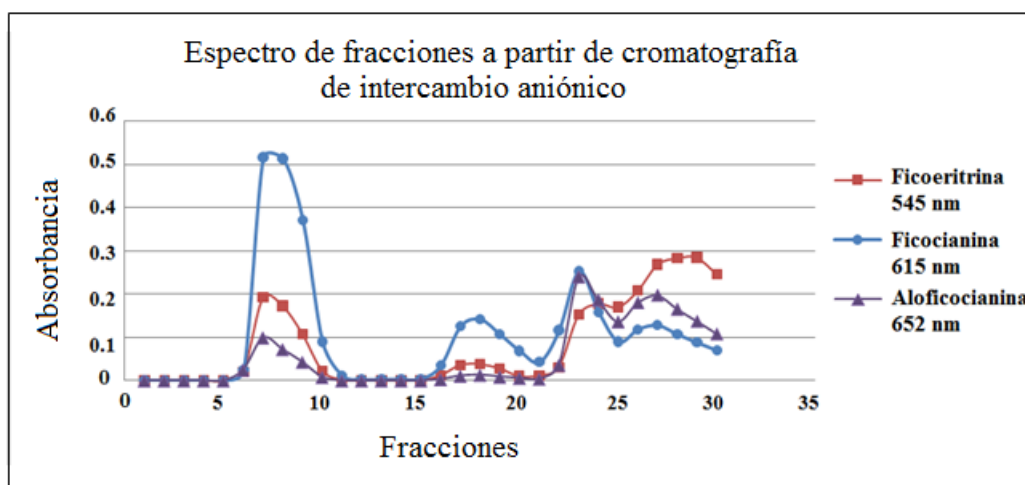


Figura 8. Espectro de fracciones de cromatografía de Intercambio Aniónico. La absorbancia para ficoeritrina (545 nm), ficocianina (615 nm) y aloficocianina (650 nm) para cada fracción se representa por la línea roja, azul y morada, respectivamente.

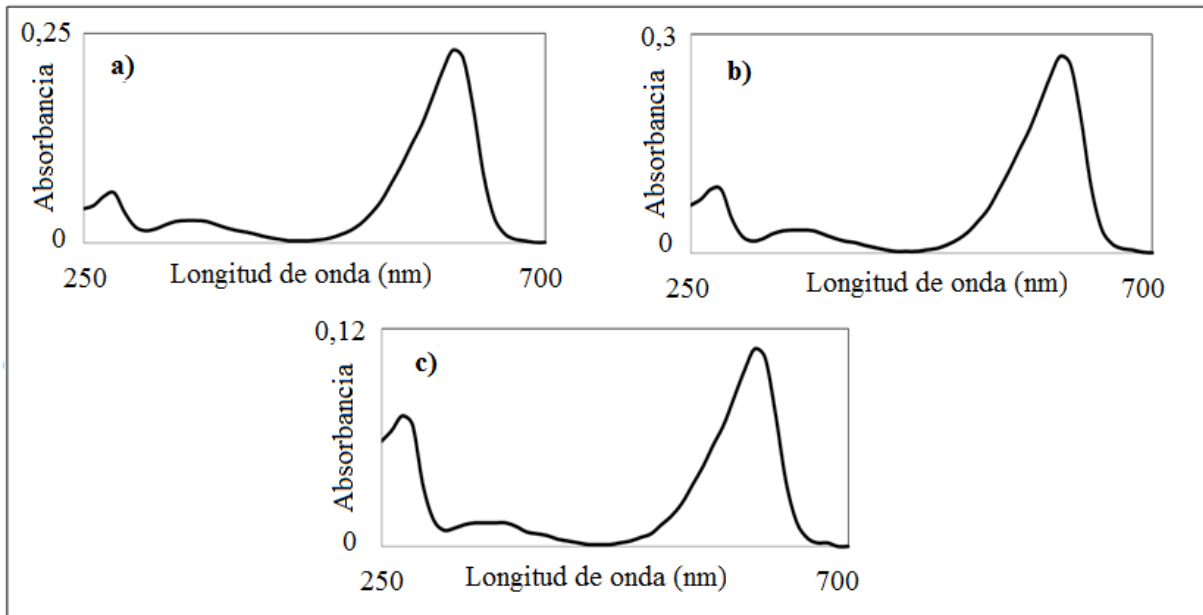


Figura 9. Espectro de pool de ficocianina a partir de la cromatografía de Intercambio Aniónico, a) Fracción 1 (Pureza > 3), b) Fracción 2 (Pureza $> 2 < 3$) y c) Fracción 3 (Pureza $> 1 < 2$).

VII.2.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Para elevar la pureza de la ficocianina en las fracciones 1, 2 y 3 colectadas en la cromatografía de intercambio aniónico, éstas fueron sometidas a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). A las fracciones resultantes de HPLC se les aplicó un barrido espectral para determinar grado de pureza y concentración de ficocianina. Las fracciones con $A_{615}/A_{280} > 4$ se juntaron en un pool denominado “Fracción 1 HPLC”, fracciones con $A_{615}/A_{280} > 3 < 4$ se mezclaron en la “Fracción 2 HPLC” y las fracciones con $A_{615}/A_{280} > 1 < 3$ formaron la “Fracción 3 HPLC”. En la Figura 10 se muestra el barrido espectral realizado a las tres fracciones anteriores provenientes de HPLC.

La pureza y concentración de ficocianina en las fracciones de HPCL 1, 2 y 3 fueron de 4.25, 5.19 y 3.6 de pureza respectivamente con 0.0243, 0.0528 y 0.0039 mg/ml de concentración de dicha proteína.

En los espectros de la Figura 10, la ficocianina se encuentra presente con un pico característico a los 615 nm. También se observan dos picos menores alrededor de los 280 y 350 nm.

Con la aplicación de los diferentes pasos de extracción y purificación de ficocianina a partir del extracto crudo saturado con sulfato de amonio (40%) de *R. marinus*, con pureza de 1.18 se logró obtener una pureza final de 4.25, 5.19 y 3.6 para las fracciones 1, 2 y 3 respectivamente, posterior a la aplicación de la Cromatografía líquida de alta resolución. En la Figura 11 se muestran los espectros de absorción obtenidos durante los diferentes pasos de extracción y purificación de ficocianina.

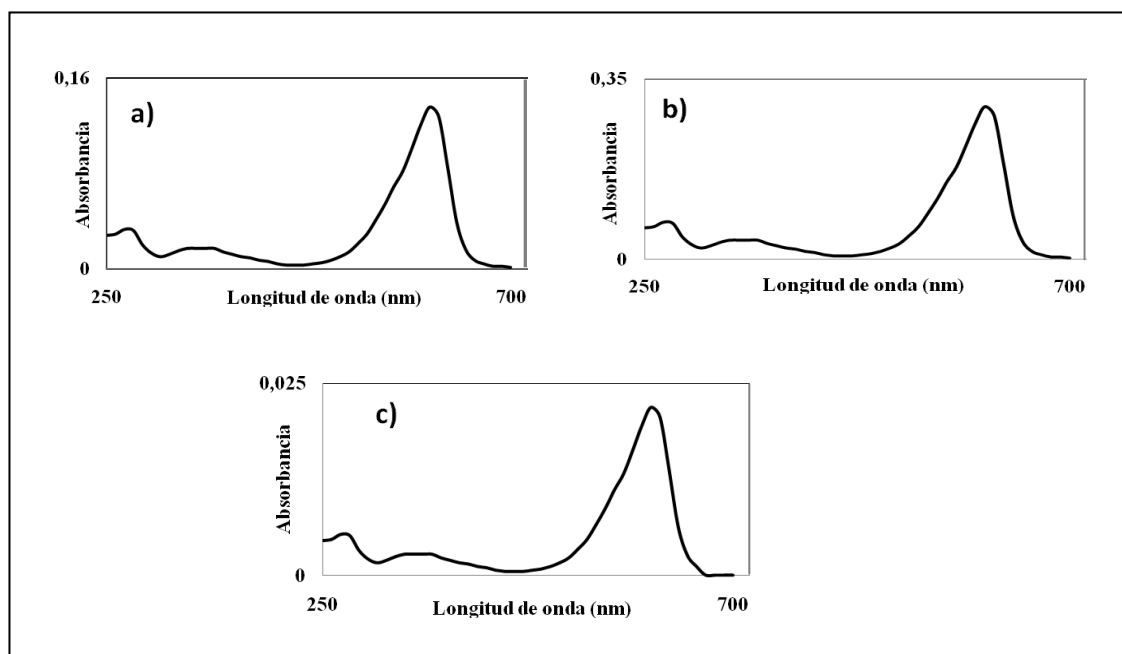


Figura 10. Barrido espectral de fracciones obtenidas por HPLC, a) Fracción 1 HPLC, b) Fracción 2 HPLC y c) Fracción 3 HPLC.

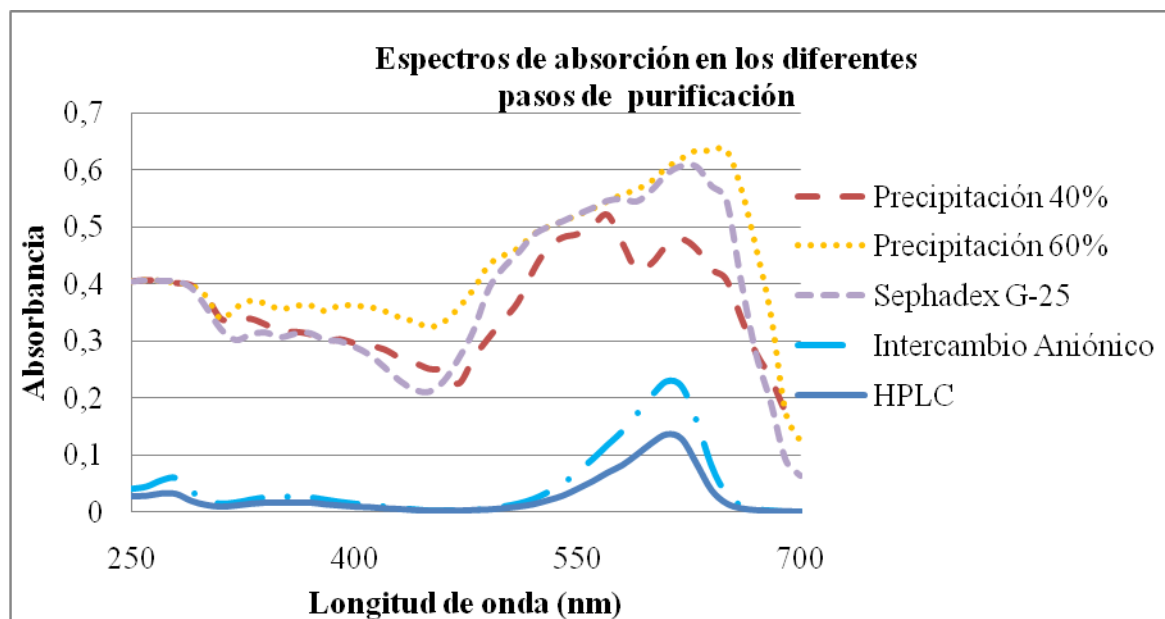


Figura 11. Espectros de absorción durante los diferentes pasos de extracción y purificación de ficocianina: saturación con sulfato de amonio al 40% (— —), saturación con sulfato de amonio al 60% (•••), cromatografía de filtración en gel (- - -), cromatografía de intercambio aniónico (— ·), cromatografía líquida de alta resolución (—).

VII.2.5. Sumario de Pureza contra Concentración de Ficocianina

La pureza y concentración de ficocianina fue monitoreada espectrofotométricamente durante los procesos de extracción y purificación. En la Tabla V se muestra la evolución de ambas variables en los diferentes pasos efectuados para la extracción y purificación de dicha proteína, también se presentan los volúmenes obtenidos en cada paso y el incremento de pureza.

En la Tabla VI se observa que el grado de pureza de ficocianina aumenta conforme avanza el proceso de purificación, alcanzando el grado de pureza analítico (mayor a 4) por la aplicación de cromatografía de líquida de alta resolución.

En la Figura 12 se muestra la pureza de la Fracción 1 (Pureza >3 en la Cromatografía de Intercambio Aniónico). Se observa cómo la pureza de la Fracción 1 aumenta, lo mismo ocurre para la fracción 2 y 3.

La concentración de ficocianina para las fracciones 1, 2 y 3 provenientes de HPLC fue de 0.0243, 0.0528 y 0.0039, respectivamente. La suma final de la concentración de ficocianina

obtenida durante el presente trabajo fue de 0.081 mg/ml de ficocianina a partir de 4 g de biomasa liofilizada de *R. marinus*.

Tabla V. Sumario de pureza, incremento de pureza, concentración y volumen de fracción con ficocianina en los diferentes pasos de purificación a partir de la microalga roja, *R. marinus*. *La precipitación con sulfato de amonio al 60% se realizó con un volumen de muestra de 150 ml, posterior a la centrifugación, el precipitado fue resuspendido en 30 ml de buffer de fosfatos, a dicha muestra se determino espectro de absorbancia.

PASOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN		PUREZA	INCREMENTO DE PUREZA	CONCENTRACIÓN (mg/ml)	VOLUMEN (ml)
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ (40%)		1.18	-	0.0535	142
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ (60%)		1.50	1.27	0.0577	30*
Filtración en Gel G-25		1.48	0.98	0.0653	30
Intercambio Aniónico	Frac 1 P > 3	3.38	2.28	0.0408	21
	Frac 2 P > 2 < 3	2.61	1.76	0.0478	47
	Frac 3 P > 1 < 2	1.62	1.09	0.0194	26
HPLC	Frac 1 HPLC	4.25	1.25	0.0243	5
	Frac 2 HPLC	5.19	1.67	0.0528	11
	Frac 3 HPLC	3.6	2.43	0.0039	3.5

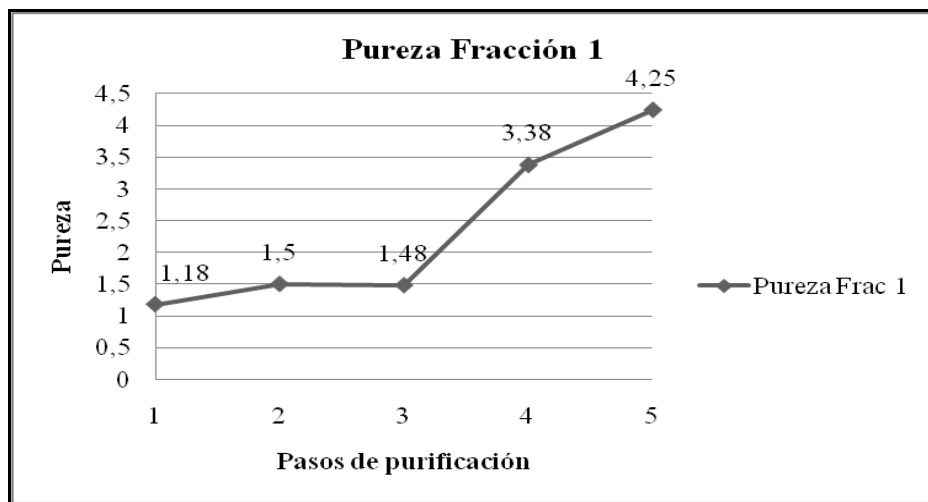


Figura 12. Pureza de la Fracción 1 (Pureza de ficocianina > 3 en la cromatografía de Intercambio Aniónico). Donde en el eje X: 1) Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40%), 2) Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (60%), 3) Filtración en Gel G-25, 4) cromatografía de Intercambio Aniónico, 5) HPLC.

VII.2.6. Determinación de Peso Molecular por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

Los resultados de electroforesis para determinar el peso molecular de las subunidades de la ficocianina purificada a grado analítico mediante HPLC, mostró la presencia de dos bandas características de las subunidades α y β de ficocianina, cuyos pesos fueron calculados en 18.4 y 20.6 kDa, respectivamente (Figura 13).

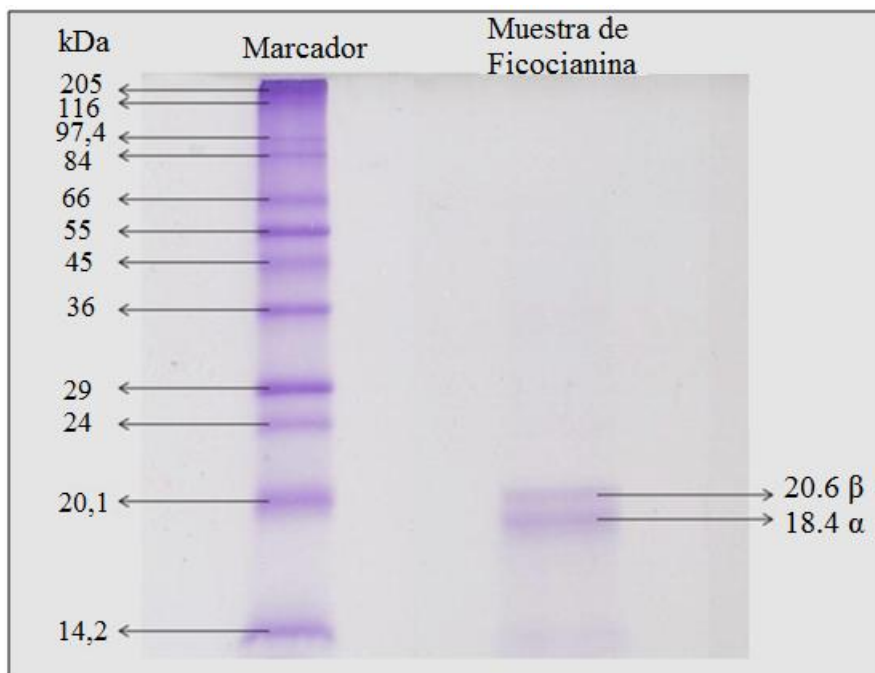


Figura 13. PAGE-SDS de pool de ficocianina con pureza mayor a 4 obtenida por HLC

VIII. DISCUSIÓN

El cultivo de la microalga, *R. marinus*, con una duración aproximada de un mes, se obtuvo una producción de 5 g de biomasa liofilizada por cada 12 L de cultivo, resultados que concuerdan con los reportados por Básaca Loya *et al* (2009).

VIII.1. Extracción y Precipitación de Proteínas

El espectro de absorción del extracto crudo de *R. marinus*, posterior a la precipitación de proteínas con sulfato de amonio al 40% mostró picos máximos a 570 y 619 nm, resultados que coinciden con el espectro reportado por Patel *et al* (2005), del extracto crudo de la cianobacteria *Lyngbya* sp., posterior a la precipitación con sulfato de amonio (50% saturación), cuyo espectro muestra un pico ancho alrededor de los 300 a 400 nm, el cual representa a las proteínas contaminantes y un pico mayor a los 620 nm, característico de la ficocianina (Figura 14).

La pureza de 1.5 de ficocianina obtenida para el extracto crudo de *R. marinus*, posterior a la precipitación de proteínas con sulfato de amonio al 60%, es mayor al reportado por Abalde *et al.* (1998), quien determinó el valor de pureza de ficocianina del extracto crudo de la cianobacteria *Synechococcus* sp. IO9201, en 0.43, aplicando un método de congelación a -21°C y descongelación a 4°C, y una solución alcalina para la extracción de proteínas (NaHCO₃ g/L y CaCO₃ g/L, pH = 10.5). Para el mismo extracto, Abalde *et al.* (1998), obtuvieron una concentración de ficocianina de 0.0271 mg/ml. En este trabajo se obtuvo 0.0577 mg/ml de ficocianina, lo cual indica que se obtuvo más del doble de lo reportado en la literatura.

Patel *et al.* (2005), determinaron la pureza de ficocianina de los extractos crudos sometidos a precipitación con sulfato de amonio al 25 y 50% de saturación para tres especies de cianobacterias, *Spirulina* sp., *Phormidium* sp. y *Lyngbya* sp. En la Tabla VI se comparan los datos de pureza de ficocianina obtenidos por dichos investigadores con los resultados del presente trabajo.

El grado de pureza de 1.18 obtenido a partir de *R. marinus*, con una saturación de 40% en lugar de 25% de sulfato de amonio, muestra ser mayor al obtenido por Patel *et al.* (2005), para las tres cianobacterias, mientras que la pureza de 1.5 obtenida con saturación al 60% para *R. marinus*, muestra ser mayor en comparación con la obtenida para *Lyngbya sp.* (Pureza de 1.46), en la investigación antes mencionada.

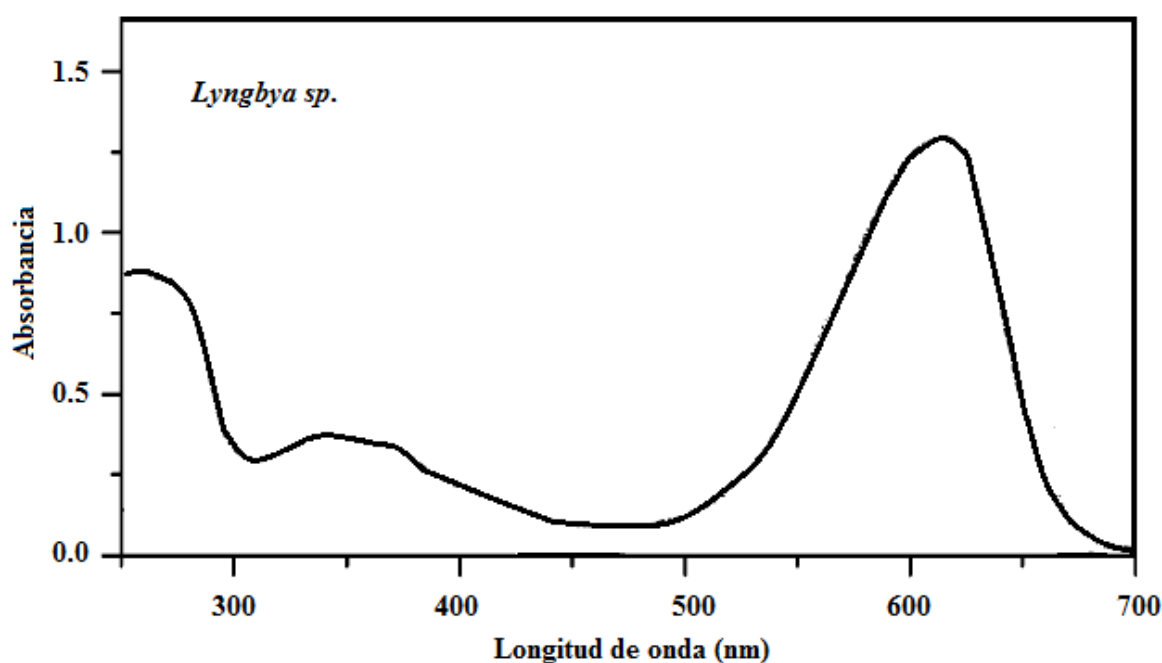


Figura 14. Espectro de absorción reportado por Patel *et al* (2005), del extracto crudo de la cianobacteria *Lyngbya sp.*, posterior a la precipitación con sulfato de amonio (50% saturación).

Tabla VI. Tabla comparativa de los índices de pureza de ficocianina de la precipitación de proteínas calculada para *R. marinus*, contra los calculados por Patel *et al.* (2005), para *Spirulina sp.*, *Phormidium sp.* y *Lyngbya sp.*

PASOS DE PURIFICACIÓN	<i>Rhodorus marinus</i>	PASOS DE PURIFICACIÓN	<i>Spirulina sp.</i>	<i>Phormidium sp.</i>	<i>Lyngbya sp.</i>
	PUREZA DE FICOCIANINA		PUREZA DE FICOCIANINA		
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ (40%)	1.18	Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ (25%)	0.82	0.73	0.91
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ (60%)	1.50	Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ (50%)	2.66	1.62	1.46

VIII.2. Cromatografías

Los espectros obtenidos para las fracciones de *R. marinus*, provenientes de la cromatografía de intercambio aniónico corresponden al reportado por Abalde *et al.* (1998), para la ficocianina obtenida de la cianobacteria *Synechococcus* sp. IO9201, a partir de cromatografía por intercambio iónico (Figura 15), en la cual detectaron dos picos mayores a 620 nm y 280 nm (característico de ficocianina y proteínas, respectivamente), el ancho del pico a 280 nm corresponde a moléculas contaminantes presentes en el extracto crudo.

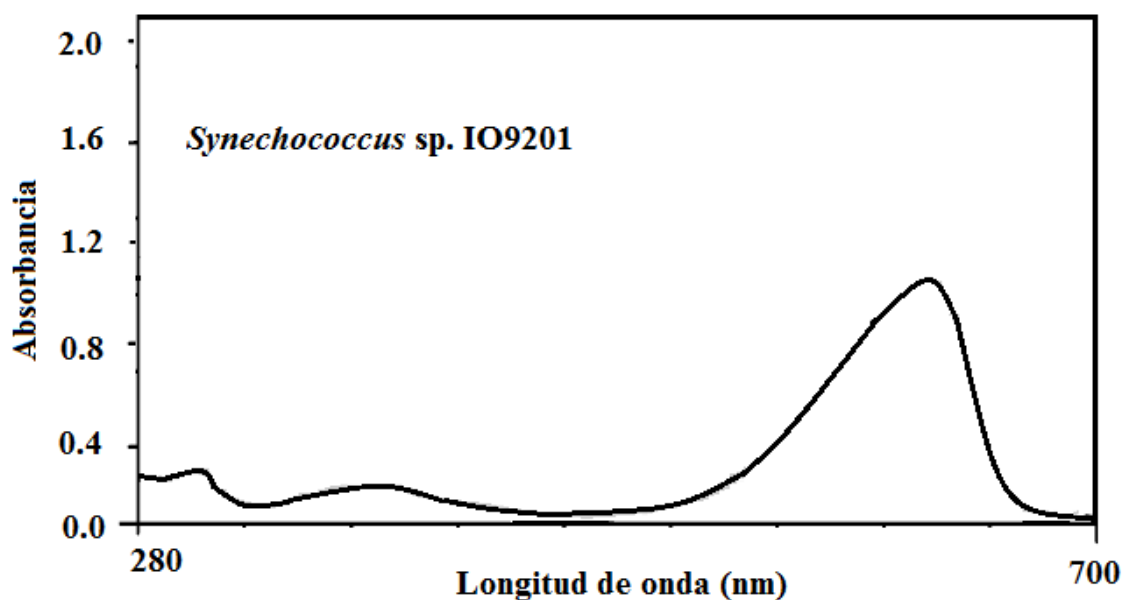


Figura 15. Espectro de ficocianina extraída de la cianobacteria *Synechococcus* sp. IO9201, a partir de cromatografía por intercambio iónico reportado por Abalde *et al.* (1998).

Abalde *et al.* (1998), obtuvieron ficocianina con pureza 4.5 extraída a partir de la cianobacteria *Synechococcus* sp. IO9201, por cromatografía de intercambio iónico en una columna de Q-Sepharosa, posterior a su purificación por cromatografía de interacciones hidrofóbicas (pureza de ficocianina 3.8). En comparación con la pureza obtenida para *R. marinus*, a partir de cromatografía de intercambio aniónico con fracciones de pureza desde

1.62 hasta 3.38, poseen valores cercanos, mientras que los valores de pureza obtenidos para *R. marinus*, aplicando HPLC resultaron en fracciones con pureza desde 3.6 hasta 5.19, este último valor es mayor al alcanzado por Abalde *et al.* (1998), (pureza 4.5), aplicando la cromatografía de intercambio aniónico.

Santiago-Santos *et al.* (2004), purificaron ficocianina a partir de la cianobacteria *Calothrix* sp. Posterior a la aplicación de cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharosa) reportaron un espectro de absorción con presencia de un pico mayor a 620 nm, correspondiente a la ficocianina y un pico menor a 280 nm, correspondiente a otras proteínas contaminantes. Los resultados anteriores concuerdan con los obtenidos para *R. marinus* en la presente investigación. Por otro lado, los resultados de ficocianina sobre el índice de pureza de 2.2, obtenido por los mismos autores, muestran ser menores a lo calculado para *R. marinus*, con una pureza máxima de 3.38.

Hilditch *et al.* (1991), a partir de la cianobacteria *Aphanothece halophytica*, lograron incrementar la pureza de extractos crudos expuestos a fraccionamiento con sulfato de amonio, aplicando cromatografía de intercambio aniónico, pasando de un grado de pureza de 1.4 a 3.5. Adicionando la cromatografía por filtración en gel en Shepadex G100, lograron incrementar hasta 4.6 de pureza. En comparación con lo obtenido en el presente estudio, pureza de 3.38 por cromatografía de intercambio aniónico, hasta 5.19 por HPLC, dicho valor supera el reportado en la investigación anterior.

En los espectros obtenidos para las fracciones provenientes de cromatografía líquida de alta resolución para *R. marinus*, la ficocianina se encuentra presente con un pico característico a los 615 nm y dos picos menores alrededor de los 280 y 350 nm. Los picos anteriores concuerdan con los reportados por Hilditch *et al.* (1991), para la ficocianina purificada de la cianobacteria *Aphanothece halophytica* (Figura 16). Hilditch *et al.* (1991), determinaron que los picos encontrados corresponden a la C-Ficocianina, cuyo índice de pureza fue de 4.8, valor superado por el obtenido para la Fracción 2 HPLC de *R. marinus*, con pureza de 5.19.

Santiago-Santos *et al.* (2004), tras aplicar cromatografía de intercambio aniónico al extracto de la cianobacteria *Calothrix* sp. obtuvieron una fracción con 2.2 de pureza de ficocianina e incrementaron dicha pureza a 3.4 al implementar la cromatografía de interacciones hidrofóbicas. Los valores anteriores también son superados por los obtenidos

con *R. marinus*, presentando un grado de pureza de 3.38 y 5.19 a partir de cromatografía de intercambio aniónico y HPLC, respectivamente.

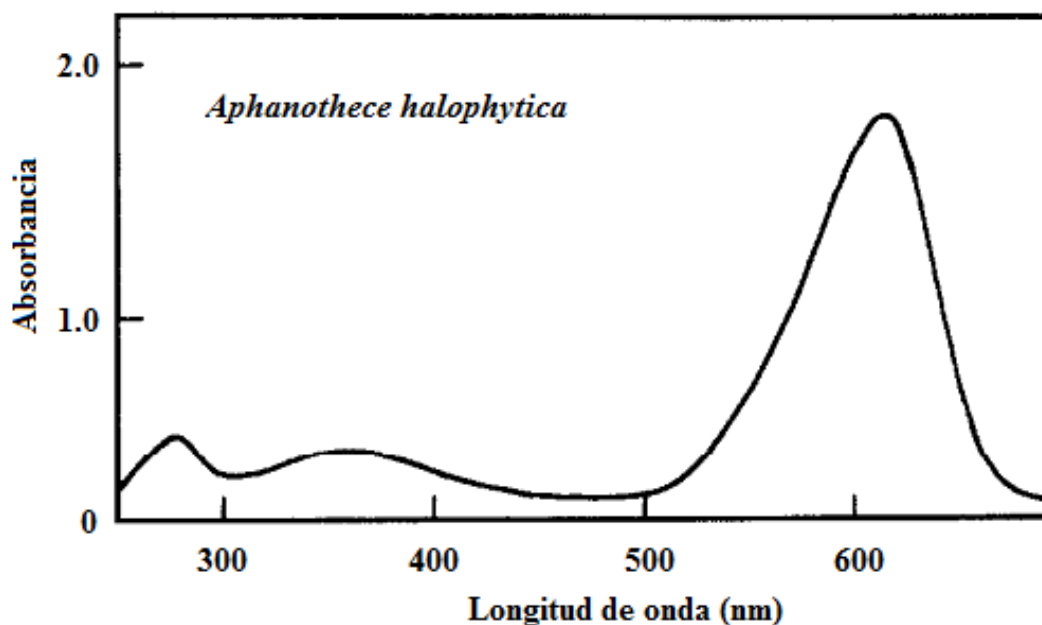


Figura 16. Espectro de Absorción de C-Ficocianina reportado por Hilditch *et al.* (1991). Exhibiendo picos característicos a 280, 360 y 620 nm.

La concentración de ficocianina obtenida durante el presente trabajo fue de 0.081 mg/ml de ficocianina a partir de 4 g de biomasa liofilizada de *R. marinus*. Básaca-Loya (2010), reportó la concentración de ficoeritrina aplicando el mismo método que en el presente trabajo, obteniendo una concentración de ficoeritrina de 1.292 mg/ml con pureza de 2.5. Dicha concentración es mayor a la obtenida para la ficocianina, sin embargo, el grado de pureza alcanzado es mayor en el presente trabajo, debido a que se realizó un mayor número de fracciones en cada paso de la purificación, permitiendo una selección más fina de las muestras con mayor pureza.

VIII.3. Determinación de Peso Molecular por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

La ficocianina obtenida a partir de *R. marinus* mostró la presencia de dos bandas características de las subunidades α y β de ficocianina, cuyos pesos fueron calculados en 18.4 y 20.6 kDa, respectivamente, valores que concuerdan con los reportados por otros autores.

Glazer y Hixson (1975), a partir de la microalga roja, *Porphyridium cruentum*, obtuvieron por PAGE-SDS dos bandas características de las subunidades de ficocianina, α y β , cuyo peso molecular fue de 18.4 y 20.6 kDa, respectivamente.

Abalde *et al.* (1998), reportaron para la cianobacteria *Synechococcus* sp., un peso molecular de 18, 98 (+/- 870) y 21.36 (+/- 980) kDa, para las subunidades α y β de ficocianina, respectivamente, valores similares a los obtenidos en el presente trabajo.

IX. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se purificó la proteína ficocianina a partir de la microalga roja *Rhodospirillum rubrum*. Esta microalga representa una fuente potencial para la extracción y purificación de ficocianina, ya que muestra un crecimiento sencillo y rápido bajo condiciones de laboratorio.

Mediante la cromatografía de intercambio aniónico con un buffer de fosfato (0.010 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y una fuerza iónica de 0.1 M de NaCl a pH 7.0 fue posible separar la ficocianina del resto de las ficobiliproteínas, con un grado de pureza de hasta de 3.38.

La aplicación de cromatografía de intercambio aniónico, interacciones hidrofóbicas y filtración en Gel ha sido ampliamente reportada para la purificación de ficocianina; sin embargo, en el presente trabajo se implementó la cromatografía líquida de alta resolución con la cual se logró la obtención de ficocianina con un mayor grado de pureza en comparación con la pureza obtenida por otros autores.

X. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar una evaluación de los porcentajes de recuperación de la ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina, obtenidas a partir de la microalga en estudio.

Posterior a la determinación del porcentaje de recuperación de ficocianina por el método descrito en el presente trabajo, se recomienda evaluar la aplicación de cromatografía de interacciones hidrofóbicas y comparar los porcentajes de recuperación, para valorar el método más apropiado de separación de ficocianina del resto de las ficobiliproteínas presentes en *R. marinus*.

XI. LITERATURA CITADA

- Abalde, J., Betancourt, L., Torres, E., Cid, A. y Barwell, C. 1998. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechoccus* sp. IO9201. *Plant Science*, 136, 109-120.
- Abd El-Baky, H. H. 2003. Over production of phycocyanin Pigment in Blue Green Alga *Spirulina* sp. and it's Inhibitory Effects on Growth of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. *J. Med. Sci.*, 3, 314-324.
- Apt, K. E., Collier, J. L. y Grossman, A. R. 1995. Evolution of the Phycobiliproteins. *J. Mol. Biol.*, 248, 79-96.
- Bermejo, R., Talavera, E. M., Alvarez-Pez, J. M. y Orte, J. C. 1997. Chromatographic purification of biliproteins from *Spirulina platensis* High-performance liquid chromatographic separation of their α and β subunits. *Journal of Chromatography*, 778, 441-450.
- Básaca-Loya, G. A., Valdez, M. A., Enríquez-Guevara, E. A., Gutiérrez-Millán, L. E. y Burboa, M. G. 2009. Extracción y purificación de B-ficoeritrina de la microalga roja *Rhodorus marinus*. *Ciencias Marinas*, 35, 359-368.
- Básaca-Loya, G. A. 2010. Evaluación de las propiedades fluorescentes e interfaciales de la proteína B-ficoeritrina purificada de la microalga roja *Rhodorus marinus*, Tesis de Doctorado. Doctorado en Ciencias de Materiales. Universidad de Sonora.
- Ducret, A., Sidler, W., Frank, G. y Zuber, H. 1994. The complete amino acid sequence of R-phycocyanin-I α and β subunits from the red alga *Porphyridium cruentum*. *Eur. J. Biochem.*, 221, 563-580.
- Eisele, L. E., Bakhru, S. H., Liu, X., MacColl, R. y Edwards., M. R. 2000. Studies on C-phycocyanin from *Cyanidium caldarium*, a eukaryote at the extremes of habitat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1456, 99-107.
- Enríquez-Guevara, E. A. 2006. *Purificación y Caracterización de B-Ficoeritrina Extraída de la Microalga Roja Rhodorus marinus*. Universidad de Sonora.
- Eriksen, N. T. 2008. Production of phycocyanin - a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80, 1-14.

- Friedrich, J., Scheer, H., Zickendraht-Wendelstadt y Haarer, D. 1981. Energy transfer in phycobiliproteins as studied by photochemical hole burning. *Journal of luminescence*, 815-818.
- Gardner, E. E., Stevens, S. E. y Fox., J. L. 1980. Purification and characterization of the C-phycocyanin from *Agmenellum quadruplicatum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624, 187-195.
- Glazer, A. N. 1988. Phycobiliproteins. *Methods in enzymology*, 167, 291-303.
- Glazer, A. N. y Hixson, C. S. 1975. Characterization of R-Phycocyanin. Chromophore content of R-Phycocyanin and C-Phycocerythrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 5487-5495.
- Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G. y Collier, J. L. 1993. The phycobilisome, a Light-Harvesting Complex Responsive to Environmental Conditions. *Microbiological Reviews*, 57, 725-749.
- Hilditch, C. M., Smith, A. J., Balding, P. y Rogers, L. J. 1991. C-Phycocyanin from the cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Phytochemistry*, 30, 3515-3517.
- Holzwarth, A. R., Wendler, J. y Wehrmeyer, W. 1983. Studies on chromophore coupling in isolated phycobiliproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 724, 388-395.
- Kronick, M. N. 1986. The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 92, 1-13.
- McCarty, M. F. 2007. Clinical Potential of *Spirulina* as a Source of Phycocyanobilin. *J Med Food*, 10, 566-570.
- Merchants, H. 2010. Hash C-PHYCOCYANIN. folleto en línea: www.hashmerchants.com
- Minkova, K. M., Tchernov, A. A., Tchorbadjieva, M. I., Fournadjieva, S. T., Antova, R. E. y Busheva, M. Ch. 2003. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, 102, 55-59.
- Molina, L., Jonte, L., Mora, R., Ortega, J. y Morales, E. 2007. Influencia de la salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Rhodorus marinu* (Rhodophyta) en cultivos discontinuos. *Rev. Fav. Agron.*, 1, 249-253.
- Niu, J. F., Wang, G. C., Lin, X. Z. y Zhou, B. C. 2007. Large-scale recovery of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography*, 850, 267-276.

- Oi, V. T., Glazer, A. N. y Stryer, L. 1982. Fluorescent Phycobiliprotein Conjugates for Analyses of Cells and Molecules. *The Journal of Cell Biology*, 93, 981-986.
- Padyana, A. K., Bhat, V. B., Madyastha, K. M., Rajashankar, K. R. y Ramakumar, S. 2001. Crystal Structure of a Light-Harvesting Protein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 893-898.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R. y Ghosh, P. K. 2005. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*, 40, 248-255.
- Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A. S. y Raghavarao, K. S. M. S. 2006. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *Journal of Chromatography*, 1127, 76-81.
- Prasanna, R., Sood, A., Suresh, A., Nayak, S. y Kaushik, D. 2007. Potentials and applications of algal pigments in biology and industry. *Acta Botanica Hungarica*, 49, 186-210.
- Rascón-Durán, A. D. 2009. Obtención de B-Ficoeritrina de la Microalga Roja *Rhodospirillum rubrum* y Evaluación in vitro de su Efecto en la Proliferación de Células de Cáncer Cervicouterino (*HeLa*). Universidad de Sonora.
- Rito-Palomares, M., Nuñez, L. y Amador, D. 2001. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. *J. Chem. Technol. Biootechnol.*, 76, 1273-1280.
- Romay, C., González, R., Ledón, N., Ramirez, D. y Rimbau, V. 2003. C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *Current Protein and Peptide Science*, 4, 207-216.
- Rosowski, J. R. y Parker, B. C. 1971. Selected Papers in Phycology. Dept. of Botany, Univ. of Nebraska, Lincoln, pp. 876
- Santiago-Santos, M. C., Ponce-Noyola, T., Olvera-Ramírez, R., Ortega-López, J. y Cañizares-Villanueva, R. O. 2004. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. *Process Biochemistry*, 39, 2047-2052.
- Sawraj, S., Bhushan, K. N. y Banerjee, U. C. 2005. Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 73-95.
- Sekar, S. y Chandramohan, M. 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *J Appl Phycol*, 20, 113-136.

- Silveira, S. T., Burket, J. F. M., Costa, J. A. V., Burkert, C. A. V. y Kalil, S. J. 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, 98, 1629–1634.
- Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U. y Madamwar, D. 2006. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*—Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry*, 41, 2017–2023.
- Soni, B., Trivedi, U. y Madamwar, D. 2008. A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycocyanin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property. *Bioresource Technology*, 99, 188–194.
- Sun, L. y Wang, S. 2003. Allophycocyanin complexes from the phycobilisome of a thermophilic blue-green alga *Myxosarcina concinna* Printz. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 72, 45–53.
- Tchernov, A. A., Minkova, K. M., Houbavenska, N. B. y Kovacheva, N. G. 1999. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. by aminohexyl-Sepharose chromatography. *Journal of Biotechnology*, 69, 69-73.
- Thomas, B. A., Bricker, T. M. y Klotz, A. V. 1993. Post-translational methylation of phycobilisomes and oxygen evolution efficiency in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1143, 104-108.
- Vargas-Rodríguez, A. L., Ramón-Gallegos, E., Vega-Barrita, M. L., Cruz-Orea, A. y Olvera-Ramírez, Roxana. 2006. Efecto in vitro de las ficobiliproteínas en el tratamiento del carcinoma cervicouterino. *Rev. del Centro de Investigación. Universidad La Salle*, 7, 5-12.
- Wang, H., Liu, Y., Gao, X., Carter, C. L. y Liu, Z. R. 2007. The recombinant β subunit of C-phycocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer Letters*, 247, 150-158.
- Zhao, F. y Qin, S. 2006. Evolutionary Analysis of Phycobiliproteins: Implications for Their Structural and Functional Relationships. *Journal of Molecular Evolution*, 63, 330-340.
- Zhu, Y., Chen, X. B., Wang, K. B., Li, Y. X., Bai, K. Z., Kuang, T. Y. y Ji, H. B. 2007. A simple method for extracting C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74, 244–248.

