



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología

**Obtención de un Extracto Proteínico Rico
en β -Ficoeritrina a partir del Cultivo de la
Microalga Roja *Porphyridium cruentum***

T E S I S

que presenta

IBQ Nadia Varinia Ortiz Bernal

como requisito para
obtener el grado de

Maestra en Ciencias

con Orientación en

Biotecnología Agropecuaria

Director de Tesis

Dra Lourdes Janeth Germán Báez

Dr Angel Valdez Ortiz

Culiacán Rosales, SIN, MEX

Febrero 2020

Presentación

El presente trabajo de investigación titulado “Obtención de un Extracto Proteínico Rico en β -Ficoeritrina a partir del Cultivo de la Microalga Roja *Porphyridium cruentum*” se realizó en el “Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética”, Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Los C Dra Lourdes Janeth Germán Báez y Dr Angel Valdez Ortiz fungieron como Directores de Tesis. Como Asesores Académicos participaron los C Dr José Guadalupe Rendón Maldonado, Dr Sergio Medina Godoy y Dr Julio Montes Ávila. La investigación recibió financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CONACyT-CB-255198) y de la Empresa MICROCELL SA de CV. La alumna Nadia Varínia Ortiz Bernal recibió “Beca Nacional para Estudios de Posgrado” (Maestría) 2017-2019 por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Agradecimientos

“Los hombres no se diferencian mucho en cuanto a intelecto, sólo en ahínco y trabajo duro”. Charles Darwin

Este trabajo de investigación es la suma del esfuerzo de muchas personas que directa o indirectamente han participado aportando ideas, conocimiento o dando ánimos, apoyándome a enfrentar los retos sin miedo, siendo críticos, pero sobre todo ayudándome a levantarme tantas veces que me he caído.

Por ello, expreso mi sincero agradecimiento por todos los consejos que con tanto cariño he recibido a lo largo de todos estos años. A todos los que han estado a mi lado **GRACIAS.**

Agradezco al Dr Ángel Valdez Ortiz, por inspirarme y apoyarme durante TODO este trayecto e incluso antes de que iniciara, gracias por mostrarme el camino cuando parecía que no había. Por tener siempre un haz bajo la manga, por conseguir las cosas que necesitaba ya fueren materiales o intelectuales, pero sobre todo, gracias por la paciencia y confianza.

De manera muy especial, a la Dra. Lourdes Janeth Germán Báez, que además de ser un pilar fundamental de este trabajo, fue un sostén y un brazo más en todos los experimentos, en las dudas y problemas una mente que veía las cosas fuera de la caja, y su tranquilidad y amabilidad hicieron los días difíciles algo sencillo y no imposible. Gracias por su tiempo, paciencia y esfuerzo.

A los C Dr Sergio Medina Godoy, Dr Hervey Rodríguez y Dr Julio Montes Ávila por permitirme trabajar en sus “Laboratorios”, por tenerme la confianza de usar sus equipos y a sus alumnos Paulino, Yalexty, Carlos y María por disipar mis dudas y apoyarme.

José Manuel, Carlos, Blas, David, Iván, Brandon, Verástica, Roxana, Mariana, Mónica, Kenia, Cynthia, Alexandra. Por su energía y su disponibilidad para apoyar en la elaboración de este proyecto y por su vibra positiva. A Karelía y Claudia que, aunque estaban ocupadas, me apoyaron cuando lo necesité.

A mis compañeros de maestría Daniel, Marco, Anna, que aunque estaban lejos, siempre nos acompañamos con dudas y problemas, pero sobre todo con

respuestas y soluciones. Luz y Marycruz ustedes han hecho de esta experiencia algo increíble, nuestras comidas, cafés o momentos juntas me daban un respiro. Marycruz sólo tú sabes cómo se ha desarrollado este proyecto, no sé cómo agradecerte todo lo que hiciste por mí, eres más que mi amiga, ya eres de mi familia. Christian Grimaldy, muchas gracias por apoyarme con tu tiempo, ánimo y consejos. Fernanda, Cynthia y vecinos de lab, su disponibilidad y su amabilidad al echarme una mano durante los análisis que se realizaron durante los experimentos. A la Dra Karen por ser dinámica, divertida y además una guía académica que siempre estuvo disponible para apoyarme en lo que me hiciera falta.

A Jorgito y Gilbertito por llevar ternura, entusiasmo y energía, que sin darse cuenta con su inocencia levantaron mi ánimo y mi espíritu.

A la Sra. Rosalva Vargas, por abrirme las puertas de su casa y por nutrir mi espíritu y estómago.

A mi inspiración, a mi compañero de aventuras, Santiago este y otros logros los dedico a ti. Gracias por saltar conmigo en este océano. Gracias por siempre estar cuando te necesito, incluso cuando ni yo me aguantaba, gracias por cuidarme, acompañarme en los días difíciles, alimentarme y darme ánimos. Te amo.

Al pilar de mi vida, **mi familia**. A mi hermana que me sonsacó siempre que pudo para que me distrajera de todo el estrés y el trabajo que tenía. A mi héroe, mi papá, que cuando veía que algo no salía bien me echaba ánimos. Y sobre todo a mi mamá que siempre quiso que obtuviera este grado y no tuvo límites en apoyarme y en decirme lo capaz que era de hacer esto y más. **Esto es por ustedes.**

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE CUADROS	ix
I RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
II INTRODUCCIÓN	1
III REVISIÓN DE LITERATURA	3
A PIGMENTOS	3
1 Pigmentos sintéticos	4
2 Pigmentos naturales	5
3 Mercado global de los pigmentos	7
4 Fuentes de pigmentos naturales	11
B MICROALGAS	15
1 Composición bioquímica	18
2 Cultivo	18
a Características del crecimiento microalgal	22
3 Usos y aplicaciones	24
4 <i>Porphyridium cruentum</i>	25
a Composición bioquímica de la biomasa celular	27
C FICOBILIPROTEÍNAS	31
1 Usos de las ficobiliproteínas	36
2 Ficoeritrina	38
a Usos y aplicaciones de la BPE	42
b Propiedades funcionales	43
c Obtención	44
IV JUSTIFICACIÓN	48
V HIPÓTESIS	49
VI OBJETIVOS	50
A OBJETIVO GENERAL	50
B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50

VII MATERIALES Y MÉTODOS	51
A MATERIALES	51
1 Microalga	51
2 Medio de cultivo	51
B MÉTODOS	51
1 Cultivo de <i>Porphyridium cruentum</i>	51
2 Establecimiento de las cinéticas de cultivo de <i>P. cruentum</i>	53
a Curva de densidad celular	53
1) Tasa de crecimiento específico (μ)	55
2) Tiempo de duplicación (dt)	55
b Curva de concentración de ficobiliproteínas	56
3 Obtención de biomasa de <i>P. Cruentum</i>	56
a Recuperación de biomasa microalgal	57
b Caracterización bioquímica	57
4 Extracción de BPE	58
a Ruptura celular	58
b Temperatura de extracción	60
c Concentración de biomasa y tiempo de calentamiento	60
5 Caracterización por electroforesis (SDS-PAGE) del extracto de BPE	63
6 Determinación de la capacidad antioxidante (CAOX)	63
a DPPH	63
b ABTS	64
c FRAP	65
7 Ensayo <i>in vitro</i> de la capacidad antihipertensiva	65
8 Análisis estadístico	66
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
A CINÉTICAS DEL CULTIVO DE <i>P. cruentum</i>	68
1 Establecimiento de la curva de crecimiento	68
a Determinación de parámetros cinéticos	72

b	Curva de concentración de ficobiliproteínas	73
B	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA	75
1	Recuperación de la biomasa microalgal	75
2	Caracterización bioquímica	79
C	OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO PROTEÍNICO RICO EN BPE	82
1	Ruptura celular	82
2	Temperatura de extracción	84
3	Efecto de la concentración de biomasa y tiempo de calentamiento sobre la extracción de BPE	85
D	CARACTERIZACIÓN ELECTROFORÉTICA DEL EXTRACTO PROTEÍNICO DE BPE	88
E	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVA DEL EXTRACTO PROTEÍNICO RICO EN BPE	92
1	Capacidad antioxidante	92
2	Actividad antihipertensiva <i>in vitro</i>	94
IX	CONCLUSIONES	98
X	BIBLIOGRAFÍA	99
	Abreviaturas	123
	Anexos	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig	Descripción	Pág.
1	Comercialización de pigmentos en México	9
2	Comportamiento típico de una curva de crecimiento microalgal	23
3	Imagen al microscopio de células del género <i>Porphyridium</i>	29
4	Aspecto general de la microalga roja unicelular <i>Porphyridium</i>	30
5	Ficobilisoma situado en la membrana tilacoide	33
6	Modelo de rizos de hexámero	34
7	Ruta de biosíntesis de ficobilinas a partir de Biliverdina	36
8	Estructuras de las subunidades de bilina presentes en la ficoeritrina	40
9	Estructura del complejo proteico de la β -ficoeritrina (BPE)	42
10	Esquema general de trabajo	52
11	Cálculo del número celular utilizando el hemocitómetro	54
12	Diagrama de proceso para la evaluación de diferentes métodos de ruptura celular	59
13	Diagrama de proceso para determinar temperatura de extracción	61
14	Estrategia para la determinación del efecto de la concentración de biomasa de <i>P. cruentum</i> y del tiempo de calentamiento, sobre la pureza y concentración de BPE	62
15	Curva de crecimiento celular del cultivo de <i>P. cruentum</i>	70
16	Concentración de ficobiliproteínas respecto a los días de cultivo de <i>P. cruentum</i>	74
17	Floculación de la biomasa celular de <i>P. cruentum</i> a diferentes concentraciones de quitosano	76
18	Efecto de la concentración de quitosano sobre la eficiencia de floculación de la biomasa de <i>P. cruentum</i>	77

19	Efecto del método de ruptura celular sobre Índice de efectividad en la extracción de BPE	83
20	Efecto de la temperatura de extracción sobre el índice de efectividad para BPE	86
21	Efecto de la concentración de biomasa y tiempo de calentamiento en el índice de efectividad para la obtención de un extracto proteínico rico en BPE	87
22	Análisis por SDS-PAGE del extracto de BPE	89
23	Esquema del complejo de β -ficoeritrina a pH fisiológico	90
24	Curva de inhibición <i>in vitro</i> de ECA para el extracto proteínico rico en BPE	95

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Clasificación de microalgas de acuerdo al tipo de pigmentos que poseen	18
2	Composición general de macronutrientes en algunas especies de microalgas	19
3	Principales requerimientos de los cultivos de microalgales	21
4	Aplicaciones biotecnológicas de algunas especies de microalgas	26
5	Comparación de condiciones de cultivo de <i>P. cruentum</i>	71
6	Composición bioquímica de la biomasa de <i>P. cruentum</i>	80
7	Capacidad antioxidante del extracto proteínico rico en BPE	93

I RESUMEN

El crecimiento global actual ha provocado que la industria se encuentre en constante innovación; además, las demandas del consumidor que busca productos más naturales, sin conservadores y que no afecten su salud han ayudado en este transitar. En el caso particular de la industria alimentaria, uno de los factores decisivos para la compra de cualquier producto, es su color, por lo que a lo largo de las últimas décadas se han desarrollado pigmentos sintéticos que mejoran el color de los alimentos, sin embargo, recientemente se ha encontrado que la mayoría de estos pigmentos afectan la salud del consumidor, por lo que ahora, se buscan alternativas para disminuir o evitar su uso. En este sentido, existen pigmentos naturales que han sido aislados de diferentes fuentes naturales tales como plantas, bacterias, hongos y microalgas, los cuales son actualmente utilizados en los alimentos para mejorar su color, sin afectar la salud del consumidor, ni alterar negativamente el aspecto o sabor de los alimentos. En el caso de los colorantes vegetales, estos, tienen como desventaja la dependencia del abasto de su materia prima, la cual es influenciada principalmente por las condiciones agroclimáticas; mientras que en microorganismos como las microalgas, esta desventaja se ve minimizada, además de que, pueden utilizarse como una fuente natural de una gran variedad de compuestos de interés como lípidos, polisacáridos, proteínas, así como pigmentos, por lo que en los últimos años su cultivo ha despertado un gran interés. Dentro de los pigmentos microalgales, las ficobiliproteínas, han recibido un interés biotecnológico particular, por su aplicación como colorantes alimentarios, como fármacos, ó en la industria cosmética, entre otros. Entre estas ficobiliproteínas, la β -ficoeritrina (BPE) representa un potente colorante natural, y es extraída de los ficobilisomas de microalgas rojas o cianobacterias. La microalga en la que se ha logrado un mejor rendimiento en la extracción de este pigmento es *Porphyridium cruentum*, una microalga roja de agua salada. Por lo que, en el presente trabajo se utilizó esta microalga para la obtención

de un extracto proteínico rico en β -ficoeritrina, el cual pueda ser potencialmente empleado como colorante alimentario o en la industria farmacéutica. Para lograr ésto, primeramente se estandarizó el protocolo de obtención de biomasa de *P. cruentum*, logrando cultivar la microalga a escala laboratorio y su recuperación por medio de floculación con quitosano (5 mg L^{-1}) al día 15, tiempo en el cual se presentó la mayor concentración de BPE en el cultivo ($0.2830 \text{ mg mL}^{-1}$). Posteriormente, se procedió a la extracción de la BPE por medio de un método de ruptura celular basado en el aumento de temperatura en placa de calentamiento con agitación, encontrando que el mejor tratamiento fue aquel en el que se empleó una temperatura de 50°C por 30 min, y una concentración de 5% de biomasa microalgal en agua desionizada. Bajo este procedimiento fue posible obtener un extracto proteico con una concentración de 0.05 mg mL^{-1} de BPE con una pureza de 2.3. Dicho extracto fue caracterizado por SDS-PAGE, donde se pudo corroborar la presencia mayoritaria de proteínas de peso molecular aproximado al reportado previamente para las subunidades α y β de la BPE (20 kDa) y para el heteropolímero de $(\alpha\beta)_3\gamma$ (150 kDa). Finalmente, se evaluó *in vitro* la actividad antihipertensiva y antioxidante del extracto, encontrando un IC_{50} de $0.01039 \mu\text{g mL}^{-1}$. La capacidad antioxidante (CAOX) se determinó mediante ensayos de DPPH, ABTS y FRAP, obteniéndose valores de 1117.18, 892.70 y 3755.82 $\mu\text{mol ET / g BPE}$, respectivamente.

ABSTRACT

The worldwide population growth has provoked that the food industry is constantly innovating, moreover the consumer needs and the desire for using more natural and without conservants products that do not affect the health of the consumers, have helped to the increase of this development. In this particular industry, one of the most important factors for a consumer to buy any product, is the color, because in the last decades it has been found that many synthetic pigments that improve the color in some foods, also affect the the consumers health, that is why the search for alternatives that reduce or substitute these products has also increased.

There are natural pigments that have been isolated from plants, fungi, bacteria, and microalgae, that are nowadays used in food to improve its color, because they do not affect the health of the consumer, nor affect negatively the flavor or the aspect of the product. Some of these vegetables dyes have as disadvantage that they depend on the existance of the product, which depends on the agro-climatic conditions; while, in microorganisms like microalgae, this disadvange is minimized. In addition, they can be used as a natural source of a great variety of compounds like lipids, proteins, polysaccharides and pigments, that is why in the last few years its culture has gained interest.

The pigments of microalgae comprehend the phycobiliproteins, which have received a particular biotechnological interest, because its application as a food colorant, in pharmacological compounds and in the cosmetic industry. Among these phycobiliproteins, the β -phycoerythrin (BPE), represents a potential natural colorant and it is extracted from the phycobilisomes of red microalgae and cyanobacteria. The red microalgae that has accomplished an effective capacity of extraction of this pigment is *Porphyridium cruentum*, a microalgae from salted water.

Consequently, in the present work this microalgae has been used for the obtainment of a protein extract rich in β -phycoerythrin, that can be potentially used as a food colorant or in the pharmacological industry. To accomplish this,

first the protocol of *P. cruentum* biomass collection has been standardized, achieving the culture of this microalgae in a lab scale and its recovering by flocculation with chitosan (5 mg L^{-1}) the day 15, time in which, was the day with major concentration of BPE in the culture ($0.2830 \text{ mg mL}^{-1}$). After that, it was proceeded to the extraction of BPE by a disruption cell method, based on the increase of temperature in a heating plate with agitation. It was found that the best treatment is the one in which is employed 50°C for 30 min, with a microalgal biomass concentration of 5% in deionised water. Under this treatment it was possible to obtain a protein extract with a concentration of 0.05 mg mL^{-1} of BPE and purity of 2.3. The extract was characterized by SDS-PAGE, in which was proved the presence of major proteins with a molecular weight near to the already reported for the subunits α and β from BPE (20 kDa) and for the heteropolymer of $(\alpha\beta)_3\gamma$ (150 kDa).

Finally, it was evaluated the antihypertensive and antioxidant activity of the extract, obtaining an IC_{50} value of $0.01039 \text{ } \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. The antioxidant capacity (AOXC) has been determined by DPPH, ABTS and FRAP essays, showing mayor values of 1117.18, 892.70 and 3755.82 ($\mu\text{mol ET / g BPE}$) respectively.

INTRODUCCIÓN

El color de los alimentos es un factor determinante para las decisiones del consumidor, por lo tanto, la industria ha recurrido a la producción sintética a gran escala de pigmentos sintéticos, con el objetivo de satisfacer su creciente demanda. Sin embargo, los colorantes artificiales se han asociado con mucha frecuencia a problemas de salud que van desde alteraciones en la conducta, reacciones alérgicas y hasta la promoción de diferentes tipos de cáncer. Por ello, y por las tendencias actuales en las exigencias del consumidor se ha revolucionado el uso de los colorantes hacia alternativas naturales, expandiéndose esta tendencia cada vez más en los diversos sectores de la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, entre otras (Ayyagari y col., 1995; Espinoza-Escalante, 2017).

Los colorantes naturales son considerados, en general, como compuestos inocuos y consecuentemente, las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que poseen los colorantes sintéticos. Sin embargo, el número de colorantes naturales y su gama de colores son escasos en relación con las necesidades reales de este tipo de compuestos en sectores industriales (Ruiz-Ortega, 2012).

Dentro de las diversas fuentes de producción y obtención de pigmentos naturales, las microalgas presentan diversas ventajas tecnológicas tales como: su capacidad para producir una amplia gama de pigmentos, a elevadas concentraciones; así como también debido a la facilidad y rapidez con las que crecen estos microorganismos, y su capacidad para adaptarse a diversos ambientes (Lora-Vilchis y col., 2016). En este sentido, la microalga unicelular *Porphyridium cruentum* produce grandes cantidades de polisacáridos con un gran número de usos potenciales, pero es principalmente utilizada para la extracción de β -ficoeritrina (BPE), una ficobiliproteína contenida en los

ficobilisomas presentes en microalgas eucarióticas y cianobacterias (Benavides y Rito-Palomares, 2004).

La BPE, al ser una biliproteína, es utilizada como marcador fluorescente de células y macromoléculas en investigación biomédica y en técnicas que requieren una alta sensibilidad a la fluorescencia (Glazer, 1999). También se ha demostrado su valor terapéutico por su actividad anticarcinogénica e inmunomoduladora, y sobre todo, puede ser usada como colorante natural, en sustitución de los colorantes sintéticos que son usualmente tóxicos o inseguros (Bermejo y col., 2003). Por ello, esta macromolécula posee un enorme potencial para su uso en la alimentación, cosmetología y farmacología, constituyendo una alternativa real para el incremento y diversificación de la oferta actual de colorantes naturales existente en el mercado (Ramos y col., 2010; 2011).

En base a lo anterior, en el presente trabajo, nos planteamos la obtención de un extracto proteínico rico en BPE a partir del cultivo de la microalga roja *P. cruentum*; incorporando un análisis de su actividad funcional.

II REVISIÓN DE LITERATURA

A PIGMENTOS

El hombre ha usado colorantes desde tiempos prehistóricos, como se puede ver reflejado en las pinturas de Europa, África, Egipto y China, siendo estos dos últimos sitios especialmente sobresalientes, ya que los encontrados en estas pinturas son los pigmentos sintéticos más antiguos que se han descubierto, llamados Azul Egipcio ($\text{CaCuSi}_4\text{O}_{10}$), Azul Han ($\text{BaCuSi}_4\text{O}_{10}$) y Morado Han ($\text{BaCuSi}_2\text{O}_4$) (Rao y col., 2017).

Los colorantes o pigmentos se caracterizan por su habilidad para absorber o emitir luz en el rango visible (400-700nm). Éstos se han estudiado intensamente en los últimos años con respecto a sus estructuras y a su sistema de producción, debido a su creciente demanda en diversas áreas de la industria alimentaria, farmacéutica y cosmetológica, entre otras (Rao y col., 2017).

En particular, en la industria de los alimentos, estos aditivos se utilizan para cumplir diferentes funciones, por ejemplo:

- Restaurar el color original del alimento, cuando este se haya destruido por efecto de algún proceso tecnológico, o por las condiciones de almacenaje a las que se someta el alimento.
- Corregir variaciones naturales en la intensidad del color, manteniendo su uniformidad.
- Intensificar el color propio del alimento cuando éste es débil y poco uniforme. Por ejemplo, en yogurt adicionado con fruta.
- Otorgar al alimento un color que lo identifique y le dé una apariencia atractiva, ejemplo de esto son bebidas, helados, jaleas, postres y caramelos.

Así, al agregarlos a los alimentos los colorantes o pigmentos ayudan a mejorar su aceptabilidad, porque otorgan un color definido, uniforme y constante para un mismo producto aún en distintos lotes de fabricación y épocas del año (FDA, 1993).

Los pigmentos usados en los alimentos pueden ser divididos en dos grupos: los existentes en la naturaleza o aislados de fuentes naturales, y los sintetizados químicamente (Salem y col., 2009).

1 Pigmentos sintéticos

Este tipo de pigmentos han sido ampliamente usados en la industria a través de los años; corresponden a aquellos que elabora el hombre a través de procesos de síntesis química y que no existen por sí mismos en la naturaleza. El primer pigmento sintético, mauveína, fue desarrollado por Sir William Henry Perkin en 1856, comenzando con esto la revolución histórica de los colorantes sintéticos. El empleo de este tipo de compuestos avanzó rápidamente cubriendo la demanda del mercado, ya que eran sencillos de producir, menos costosos y no impartían sabor a los alimentos, además, eran superiores en las propiedades de color por lo que solo se necesitaban en cantidades pequeñas. Los fabricantes de estos pigmentos ofrecían más de 80 colores artificiales, sin embargo, muchos de ellos nunca fueron probados en relación a su toxicidad y sus efectos adversos, lo que dio lugar a efectos secundarios negativos en la salud y en el ambiente (Downham y Collins, 2000). Por ejemplo, actualmente se sabe que los colorantes como la tartrazina, que va de rojo a amarillo, provocan alergias tanto solos como en combinación con otros pigmentos y a pesar de que algunos pigmentos sintéticos han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) para su uso en alimentos, fármacos y cosméticos, su uso ha sido relacionado con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer (Manikprabhu y Lingappa, 2015).

Por un lado, los pigmentos sintéticos son compuestos fáciles de conseguir y de formular, con bajos costos de producción, además de ser relativamente estables, ya que en su estado natural no son alterados fácilmente por microorganismos; sin embargo, su mayor inconveniente está en que no aportan una gama cromática excesivamente amplia, es decir, mediante la mezcla de diferentes tipos de colorantes inorgánicos sólo se conseguirá un número de colores limitado. Algunos pigmentos inorgánicos no se usan en sí para aportar coloraciones directamente, sino para conseguir brillos, es decir, lograr un aspecto nacarado; en este sentido, los principales pigmentos inorgánicos son los óxidos de hierro y dióxido de titanio combinados con mica (mineral múltiple con colores muy diversos). La primera combinación (óxido de hierro-mica) aporta un efecto metalizado, y la segunda (dióxido de titanio-mica) un color blanco plateado (Morones-Ramírez y col., 2015). Desde el punto de vista ambiental, también presentan desventajas, ya que la descarga poco ética del material industrial con colorantes produce toxinas que persisten por largos periodos y además son muy estables permaneciendo durante mucho tiempo erosionando el ambiente (Babitha, 2009).

2 Pigmentos naturales

Los pigmentos naturales son extraídos de fuentes renovables, generalmente de plantas, insectos, hongos, algas, y diversos microorganismos como microalgas y cianobacterias. Estos pigmentos usualmente son obtenidos usando agua o solventes orgánicos tales como diferentes tipos de alcoholes (Aberoumand, 2011).

Entre los pigmentos naturales más utilizados se encuentran los carotenoides, clorofilas, flavonoides, betalainas, taninos, mioglobina, hemoglobina, quinonas, xantonas, entre otros; siendo los más utilizados los carotenoides, que son isoprenoides lipofílicos sintetizados por los organismos fotosintéticos, incluidas las plantas, algas y cianobacterias, así como por algunas bacterias no

fotosintéticas y hongos. En la naturaleza podemos encontrar dos tipos de carotenoides: los carotenos como el β -caroteno, que son hidrocarburos lineales que se pueden ciclar en uno o ambos extremos de la molécula; y las xantofilas, que son derivados de carotenoides oxigenados como la luteína, violaxantina, neoxantina y zeaxantina. Los carotenoides se emplean como suplemento alimenticio, en el teñido, en productos farmacéuticos, cosméticos y alimentos para animales. Investigaciones recientes han demostrado su capacidad para reducir los riesgos de padecer numerosas enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular. Una ventaja de los carotenoides es su capacidad de producción en condiciones controladas, es decir, que no depende del clima, la estación del año o el tipo de suelo, aunque lo anterior dependerá en gran medida de la fuente (Valduga y col., 2009).

En general, los colorantes naturales presentan uniformidad del color, bajo riesgo por contaminación microbiana, y sus costos de producción son relativamente bajos; sin embargo, tienen una capacidad de tinción menor comparados con los sintetizados químicamente, ya que son más sensibles a la luz, temperatura, oxígeno y pH (Salem y col., 2009). A pesar de esto, la demanda por pigmentos naturales ha ido en aumento debido principalmente a los efectos tóxicos y carcinogénicos encontrados en los pigmentos sintéticos (Amate y col., 2010; Manikprabhu y Lingappa, 2015).

En este sentido, en los últimos años el interés del consumidor tanto por el cuidado de su salud, como el conocimiento sobre el riesgo por el uso de los colorantes sintéticos en los alimentos han aumentado. La FDA en Estados Unidos de América, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en Europa, y muchos otros organismos alrededor del mundo, han restringido el uso de colorantes sintéticos en alimentos, confitería y bebidas, debido a su asociación confirmada o a su sospecha, en el desarrollo de cáncer o de reacciones alérgicas,

trastornos de hiperactividad, alergias y déficits de atención, entre otros (Kobylewski y Jacobson, 2010; Martelli y col., 2013).

Para considerar los pigmentos naturales como colorantes, la estabilidad, el rendimiento y el precio son factores determinantes. La mayoría de los pigmentos naturales son sensibles al pH, el calor y la luz (Parra-Ortega, 2004). Debido a estos factores, los pigmentos naturales han ganado importancia principalmente, por su actividad nutracéutica, farmacéutica, cosmética, y por la creciente conciencia ambiental de los consumidores. Esta demanda de colorantes naturales por la industria alimentaria ha crecido rápidamente (Aberoumand, 2011). Actualmente, la población interpreta el contenido de productos sintéticos como un contaminante, y esta tendencia ha sido reforzada, ya que existen un gran número de ventajas de usar pigmentos naturales sobre los sintéticos, por lo que actualmente, los productos tienen un mejor valor de mercado si contienen colorantes naturales (Kaur y col., 2019).

3 Mercado global de los pigmentos

El Mercado global de la industria de pigmentos para uso alimentario en el año 2012 fue de 1,615 millones de dólares y se estima que en el 2018 este valor ascendió a unos 2,154 millones de dólares, a una tasa de crecimiento anual compuesto de 4.3% entre los años indicados (Newswire, 2012). Se espera que el mercado global de colorantes y pigmentos llegue a 46,400 millones de dólares para el 2025 (Grand View Research, 2017).

En el 2012 el consumo mundial de estos aditivos en la industria de alimentos fue de 49,600 toneladas, y se estimó un crecimiento en la tasa anual de 3.8% entre 2013 y 2018. En el caso de EE.UU., el consumo de estos productos creció significativamente en alimentos para niños tales como confites, bebidas y snacks. Durante el período 2008 – 2011, los principales proveedores fueron Los Países Bajos, Alemania, España y Perú (Trade Map, 2011). Los cuatro principales

compradores en el mismo período fueron Japón, EE.UU., Alemania y México; siendo este último el comprador número uno en 2011. Se espera que el crecimiento de la demanda de estos productos durante los próximos años, esté dado por el aumento del consumo de alimentos procesados y congelados, especialmente en Asia Pacífico y América Latina. Igualmente, su uso en nuevas aplicaciones como alimentos horneados, dulces, cervezas y otras bebidas alcohólicas, ayudaría a dicho aumento. Del 2015 al 2018, el crecimiento anual de este mercado fue de 6.22%, y se estima que en el 2019, este crecimiento ascienda entre el 10 al 15% anual (Carmona, 2013).

El mercado global de los pigmentos se centra principalmente en los alimentos (70%); los refrescos (27%); y las bebidas alcohólicas (3%). A su vez, este mercado se distribuye el 36% en Europa, 28% en Estados Unidos, 10% en Japón, 8% en China y 18% en Canadá, Australia y mercados emergentes, tales como India y Brasil (Mintel and Leatherhed Food Research, Newswire, 2011).

En México, la producción de los pigmentos y colorantes, hasta el año 2016, fue de alrededor de 250,000 toneladas, los valores de importación ascendieron a 190,000 toneladas, los de exportación a alrededor de 240,000 toneladas y el consumo nacional aparente de pigmentos para el mismo año fue de 200,000 toneladas, tal como se observa en la Figura 1a.

Durante el año 2015 se registró un incremento de 2.7%, lo que significó un volumen de producción de 5,298 toneladas; aún así, las importaciones presentaron un avance de 10,236 toneladas, mientras que las exportaciones avanzaron 2,660 toneladas, por lo tanto, el Consumo Nacional Aparente creció en 6.4%, lo que representó 12,875 toneladas más que en 2014 (ANIQ, 2016). Estos valores de producción impactaron en el comercio interior de los pigmentos orgánicos e inorgánicos, como se observa en la Figura 1b, el valor económico de la producción en el año 2015 incrementó con respecto al 2014 en

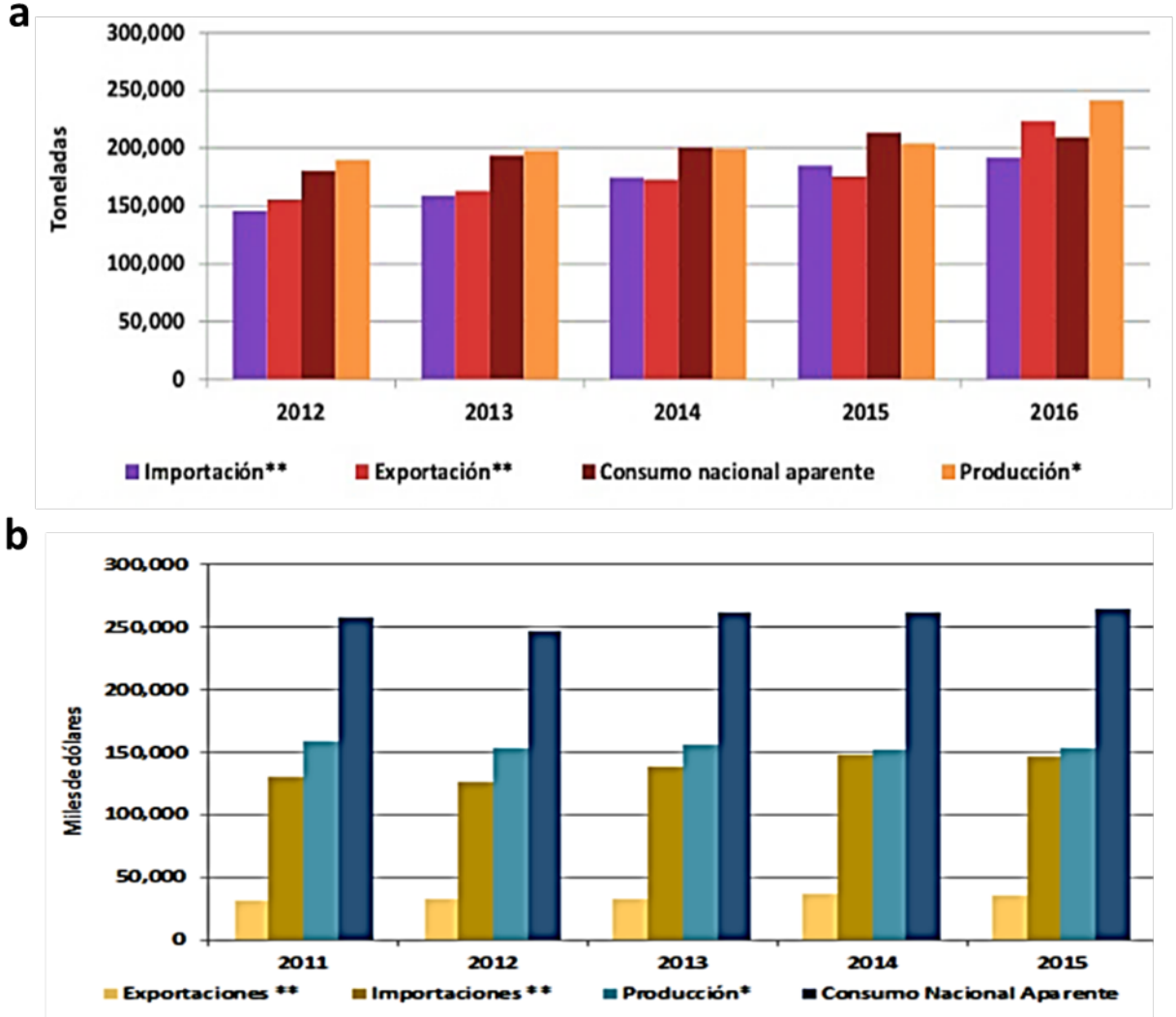


Figura 1. Comercialización de pigmentos en México. a, Toneladas de pigmentos importadas, exportadas, producidas y consumo nacional aparente, en el periodo de 2012 al 2016. b, Valor económico de las exportaciones, importaciones, producción y consumo nacional aparente en el periodo de 2011-2015 (miles de dólares). Tomada de ANIQ 2016

un 0.9%, mientras que las exportaciones e importaciones en 2015 decrecieron 5.9% y 0.8%, respectivamente; por lo tanto, el valor del Consumo Nacional Aparente creció en un 0.9%, lo que significó alrededor de 250,000 dólares en ese año (ANIQ, 2016).

El mercado mundial de pigmentos sintéticos y naturales se proyecta que alcanzará los 2.9 Billones de dólares para el 2019 (Food colors Market, 2018).

El mercado de los pigmentos indica que el 80% de los utilizados activamente como aditivos por la industria alimentaria son sintéticos (Maximize market research, 2019); sin embargo, a partir del 2017, se observó un aumento en el consumo de los pigmentos naturales, quizás debido en gran parte al avance de las tecnologías de producción y extracción que han permitido obtener colorantes naturales a menor costo y en forma más eficiente. Esta tendencia global está liderada por la comunidad europea, donde la demanda de colorantes naturales proyecta un aumento significativo del mercado en los próximos años, con un crecimiento cercano al 6.4% para el año 2020; este crecimiento no sólo se sustenta en el interés del consumidor europeo en alimentos más saludables, que incorporen colorantes naturales, sino también, por una legislación europea favorable.

Actualmente, Europa tiene autorizados 13 pigmentos naturales para ser utilizados como colorantes de alimentos: curcuma, luteína (xantofila), norbixi/bixina, capsantina (carotenoides), betalaína, ácido cármico, carmín y flavonoides. El mercado de carotenoides, clorofilas, betalainas fenólicos (flavonoides, antocianinas, taninos) y hemopigmentos, su demanda internacional, continúa creciendo a tasa superior al 6 %. Estos productos se encuentran en frutos, semillas, flores, hojas, raíces, cortezas, ramas y animales como la cochinilla o en plantas endémicas (Lastra-Marín, 2016).

Actualmente los principales productores de materias primas para colorantes naturales son Turquía, China, Francia, Italia y España; sin embargo, la creciente demanda por colorantes naturales abre la oportunidad a países en desarrollo de Latino América, África y Asia pacífico, debido a que se requiere que entren nuevos actores, con el propósito de aumentar la oferta y solucionar dificultades asociadas a la búsqueda de nuevos colorantes naturales (Pino y Zamora, 2017).

4 Fuentes de pigmentos naturales

Hasta ahora, los colorantes naturales más conocidos son: verdes, procedentes de la clorofila; amarillos, obtenido de la cúrcuma; o rojos, como el ácido carmínico procedente de insectos; los cuales suelen obtenerse mediante procesos muy costosos (Bermejo y col., 2008). Entre las fuentes tradicionales más comunes de los principales países y regiones que extraen, producen e importan, se encuentra la semilla de Achiote, un arbusto siempre verde, nativo de América Central y la zona tropical de Sudamérica, el cual se usa como extracto en la industria alimenticia y es apreciada como fuente de pigmento, que da color rojo o naranja matizado, dependiendo de las características que requiera la presentación del producto. Los principales países y regiones que lo importan son: Estados Unidos de América, Japón y Europa Occidental. Se considera a México, Centro América y al Caribe como productores, pero se desconoce los volúmenes de producción (Lastra-Marin, 2016)

El palo de tinte, *Haematoxylum campechianum*, es un pequeño árbol nativo del Sur de México y Centro América que contiene alrededor del 10% de hematoxilina, un compuesto incoloro, que al oxidarse, se transforma en una sustancia azul – violeta, conocida como hematina; la cual se ha mantenido en el mercado no obstante a la creciente utilización de tintes sintéticos. Las aplicaciones principales del palo de tinte, son para teñir telas naturales y sintéticas, así como cuero, pieles, plumas, papel, madera y la incorporación a otras tintas. Los principales países y regiones importadoras son: Estados Unidos, Japón y Europa Occidental. Las

exportaciones de palo de tinte tienen un papel importante en la economía y el desarrollo de varios países de América Central y el Caribe; las principales fuentes comerciales de este extracto han sido Jamaica, Haití y República Dominicana. Entre otros productores, se incluyen algunos países centroamericanos y Brasil; se estima que la producción mundial es de 600 toneladas anuales. (Plasencia-Vázquez y col., 2017)

Otro pigmento natural importante es la henna, *Lawsonia inermis*, árbol pequeño proveniente de una zona localizada entre Irán y el norte de la India; la extracción acuosa de esta hoja seca, provee un tinte que va desde el negro hasta el amarillo (neutral), pasando por el rojo. Históricamente, la henna ha sido utilizada como tinte para el cabello, la piel y las uñas, las hojas de esta planta también funcionan como un potente bacterioestático; en Europa Occidental y Estados Unidos su empleo como tinte para el cabello, ha incrementado su demanda notablemente. En Etiopía, es tradicionalmente utilizado para ceremonias religiosas, en numerosos festivales, y como tinte para manos. Las principales regiones importadoras son Medio Este, África del Norte, Europa Occidental y Norte América; los mayores productores son India, Pakistán, Irán, Sudán y Egipto (Kindanemariam y col., 2013)

Así mismo, el annatto, *bixa orellana*, es una planta que da una semilla rojiza producida en muchos países latinoamericanos, y durante el último siglo ha ganado importancia como cultivo en un gran número de países africanos y asiáticos. No obstante, sólo hay tres productores principales: Perú, Kenia y Brasil. Algunos productores y exportadores menores son República Dominicana, Colombia, Ecuador, Jamaica, Costa Rica y Guatemala; en el hemisferio occidental Costa de Marfil y Angola en África; e India, Sri Lanka, Tailandia y Filipinas en Asia. Se estima que la producción es 10 mil toneladas anuales. Sin embargo, las plantaciones de annatto son redituables hasta los 4 años de su inicio y sus protocolos de extracción tardados (Camacaro y col., 2018)

El proceso de extracción de pigmentos a partir de fuentes naturales, tiene como desventaja principal que es muy susceptible a variaciones, ya que puede ser influenciado por numerosas variables involucradas en el proceso de obtención empleado; por ello, su composición química, incluyendo la presencia de componentes menores, el color y la estabilidad de sus propiedades, pueden variar de lote a lote. Otras desventajas son la poca disponibilidad (dependiente de la época del año), la inestabilidad y solubilidad de los colorantes; además, a gran escala, el uso de plantas puede dar lugar a la pérdida de especies valiosas. Por estas razones, el proceso puede considerarse en general como no viable; sin mencionar que muchos consumidores no conocen la naturaleza de las fuentes exóticas de algunos pigmentos naturales autorizados. Por ejemplo, el colorante rojo carmín, es un extracto del insecto cochinilla y para producir 100 g de carmín se necesitan 14,000 insectos. Muchos de los pigmentos naturales autorizados han sido aceptados por tradición; sin embargo, se ha reportado que si estos se llevaran a escala industrial, los colorantes de origen exótico no serían aceptados. Esto brinda un gran incentivo para identificar fuentes alternativas en donde los pigmentos naturales puedan ser producidos en el futuro (Downham y Collins, 2000; Jiang y col., 2005; Mapari y col., 2005).

Los microorganismos tales como algunos hongos, bacterias y microalgas, pueden ser una fuente alternativa de pigmentos derivados (Velázquez-Arellano y col., 2016). El uso de estos modelos biológicos supone diversas ventajas tales como que a partir de ellos es posible establecer un procesamiento de extracción sencillo que sea independiente de las condiciones climáticas (Arulselvi y col., 2014).

Los pigmentos alimentarios producidos por microorganismos son comunes en la naturaleza, dentro de estos se encuentran los carotenoides, melaninas, flavinas, quinonas, monascina, violaceina, ficocianina o índigo (Duffossé y col., 2005). La producción de pigmentos por medio de microorganismos tiene bastantes ventajas, como un bajo costo de producción, permiten establecer procesos de

extracción más simple y con mayores rendimientos, en un tiempo menor al de fuentes convencionales, y, muy importante aún, su producción no es afectada por la temporada del año (Heer y Sharma, 2017); por lo que, el empleo de microorganismos que producen pigmentos alimentarios y sus productos de fermentación, aumenta cada año ya que se asume que son seguros, no tienen reacciones alérgicas, no son tóxicos, ni carcinogénicos, son biodegradables y no representan un riesgo para el medio ambiente. Por ello, la percepción de los consumidores a el uso de estos colorantes naturales ha aumentado la demanda y el interés por el desarrollo y descubrimiento de nuevos pigmentos naturales (Dharmaraj y col., 2009; Sen y col., 2019).

Los pigmentos microbianos no solamente son usados como colorantes alimentarios y agentes potenciadores de sabor, sino que también, son ampliamente utilizados en el área médica, y a que algunos de ellos son utilizados actualmente en terapias clínicas para disminuir la concentración de colesterol en la sangre, o en tratamientos para el control de la diabetes, o como antiinflamatorios (Yagilar y Yildiz, 2016).

Se han obtenido pigmentos de algunos microorganismos como *Dunaliella salina*, *Blakeslea trispora*, *Spirulina* y *Monascus*, y se estima que en el futuro será posible alcanzar rendimientos más altos utilizando la biotecnología y manipulación genética, modificando los microorganismos con la inserción de genes que permitan alcanzar este objetivo (Aberoumand, 2011).

En el caso de los carotenoides, existen más de 600 tipos diferentes, que son sintetizados por plantas y microorganismos (Park y col., 2007). Entre los microorganismos productores de carotenoides se encuentran *Serratia* y *Streptomyces* (Dharmaraj y col., 2009); y algunos microorganismos pertenecientes al género *Myxococcus* (Browning y col., 2003), *Streptomyces* (Takano y col., 2006), *Mycobacterium* (Rilling, 1962), *Agrobacterium* (Yokoyama

y Miki, 1995) y *Sulfolobus* (Hemmi y col., 2003), los cuales pueden producir estos pigmentos cuando las células se encuentran iluminadas.

Otros pigmentos producidos también por una gran variedad de microorganismos son los de color rojo, estos incluyen monascorubramina y rubropunctamina, que son análogos de los nitritos que presentan un color anaranjado; y los pigmentos amarillos donde se incluye la monascina y ankaflavina (Zhou y col., 2009).

Años atrás, existían dudas sobre la comercialización exitosa de los productos derivados de la fermentación para su uso como pigmentos alimentarios, debido a los altos costos de inversión que se requerían y los largos estudios de toxicidad que las normas reguladoras exigían. Actualmente, algunos productos fermentativos utilizados como pigmentos alimentarios ya se encuentran en el mercado, e incluso, los productos derivados de algas o productos vegetales ya son exitosamente distribuidos (Kumar y col., 2015). Algunos pigmentos de fuentes alternativas que se encuentran en el mercado son proveniente de hongos filamentosos como *Monascus*, Arpink red™, que, es extraído de *Penicillium oxalicum*; la riboflavina, de *Ashbya gossypii*; el licopeno y β -caroteno de *Blakeslea trispora*. Los pigmentos derivados de hidroxiantraquinona se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza (plantas, insectos y líquenes), y también se han encontrado abundantemente en microorganismos, particularmente en hongos filamentosos pertenecientes al género *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.*, con diferentes rangos de color (Dufossé y col., 2014).

Otra fuente importante son las microalgas que son mayormente utilizadas debido a que son fácilmente cultivadas, crecen rápidamente y son demandadas por su alto rendimiento y su capacidad para producir metabolitos (Turkcan y Okmen, 2012), además que su crecimiento puede ser controlado, no requiere el uso de herbicidas, pesticidas, u otras sustancias tóxicas, utilizando únicamente nutrientes inocuos para su crecimiento (Sen y col., 2019)

Entre los pigmentos más producidos por microalgas se encuentran las clorofilas a, b y c, el β - caroteno, astaxantina, ficocianina, xantofilas y ficoeritrina, que son frecuentemente usados en farmacología, alimentos, industria textil y cosméticos (Yangilar y Yildiz, 2016).

B MICROALGAS

Las son microorganismos que contienen clorofila y diversos pigmentos fotosintéticos capaces de llevar a cabo la conversión de la energía solar en energía química, empleando el agua como donador final de electrones. Estos microorganismos pueden llevar a cabo este proceso eficientemente, debido a su sencilla estructura celular, son responsables de más del 40% de la fotosíntesis que se lleva a cabo en la tierra, con una producción de alrededor 1011 ton (peso seco) de biomasa al año (Guerrero y Losada, 1989). Además, su capacidad para fijar el CO₂ a partir de diferentes fuentes, como la atmosférica, aguas residuales, suelos, gases de escape industrial y sales solubles de carbonato, es bastante eficiente, ya que por cada 100 ton de microalgas producidas, se consumen 183 ton de CO₂ (Chisti, 2007). Debido a esto, las microalgas son de gran relevancia para los ecosistemas acuáticos, donde contribuyen al balance de oxígeno, y gracias a ellas, se inicia el flujo de energía en estos ecosistemas. Existen algunas especies poco exigentes, que pueden vivir en condiciones extremas como cavernas, suelos desérticos, hielo o nieve perpetua, lagos hipersalinos, ácidos, alcalinos y con elevadas temperaturas (Gómez-Luna, 2007).

Las microalgas han sido tradicionalmente clasificadas según su color, ya que presentan tonalidades principalmente rojas o pardas, verdes y cafés, que se debe al pigmento fotosintético que posean en los cromoplastos. En este sentido encontramos al grupo Chlorophyta, en el cual se ubican las microalgas verdes que presentan abundante clorofila; el grupo Rhodophyta, que pertenecen las pardas o rojas, según predominen pigmentos como la ficocianina de color pardo-amarillenta o la ficoeritrina de color rojo; y el grupo Phaeophyta, que son

microalgas cafés, en las que destacan pigmentos como la clorofila c y xantofilas (Meza-Ayala., 2017).

En el Cuadro 1, se muestra otra clasificación que se da actualmente a las microalgas de acuerdo, en conjunto, al tipo de pigmentos que posean, la naturaleza química de sus productos de almacenamiento, y los componentes de la pared celular; así como diversos caracteres citológicos y morfológicos, como la presencia de células flageladas, el esquema y la trayectoria de la división nuclear (mitosis), o el proceso de división citoplasmática (Salazar-Pérez, 2012).

1 Composición bioquímica

Las microalgas son fuente de macronutrientes como proteínas, carbohidratos y lípidos (Cuadro 2), dentro de los cuales sus proteínas presentan un aminograma bastante equilibrado, similar al de la harina de soja o de pescado, así como al estándar establecido por la FAO, siendo únicamente algo deficientes en aminoácidos azufrados. Dentro de los micronutrientes, las microalgas contienen vitaminas como la A, B1, B2, B3, B9, C, D, E y H, y minerales tales como potasio, zinc, sodio, magnesio, hierro, cobalto, azufre, fósforo, nitrógeno sodio, magnesio, hierro, cobalto, azufre, fósforo, nitrógeno y calcio. Además, presentan pigmentos como clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas. Por otra parte, se considera que las microalgas presentan un alto contenido de fibra, donde la fracción soluble está compuesta principalmente de galactanos sulfatados, como agar o carragenatos en microalgas rojas, y como alginatos, fucanos y laminarin en microalgas cafés (Cáceres-Aravena, 2009; Guedes y col., 2011; Bishop y Zubeck, 2012).

Cuadro 1. Clasificación de microalgas de acuerdo al tipo de pigmentos que poseen

Clase	Características
Chlorophyta (algas verdes)	División conformada por una gran cantidad de especies, en particular por las que proliferan en ambientes dulceacuícolas. Pueden existir como células individuales o colonias. Su principal reserva de carbono es el almidón; sin embargo, pueden almacenar lípidos bajo determinadas condiciones
Bacillariophyta (diatomeas)	Las diatomeas predominan en aguas oceánicas, aunque también se les puede encontrar en aguas dulces y residuales. Contienen silicio en sus paredes celulares. Almacenan carbono de maneras diversas.
Heterokontophyta	Constituida por una gran diversidad de clases, conformada por especies similares a las diatomeas en términos de composición bioquímica y contenido de pigmentos. Algunas especies se caracterizan por su contenido de pigmentos amarillo-naranjas. Las especies de este grupo son principalmente de agua dulce, sus reservas de carbono son los lípidos y carbohidratos.

Tomado de Hu y col. (2008).

Cuadro 2. Composición general de macronutrientes en algunas especies de microalgas

Especie	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
<i>Anabeaena cylindrica</i>	50	28	6
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Clamydomonas reinhardii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	55	15	18
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	3
<i>Euglena gracilis</i>	50	16	17
<i>Porphyridium cruentum</i>	34	49	12
<i>Scenedesmus obliquus</i>	53	14	13
<i>Spirogyra sp.</i>	13	49	16
<i>Arthrospira máxima</i>	66	15	7
<i>Spirulina plantesis</i>	55	11	6
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Valores están en %. Adaptado de Becker (2007).

Los contenidos de nutrientes y pigmentos presentes en las microalgas, pueden variar, dependiendo directamente tanto de la especie como de las condiciones de cultivo, considerándose tanto la composición del medio, así como, la intensidad luminosa, temperatura, salinidad, concentración de CO₂ y el método de cosecha (Santos-Ballardo y col., 2015).

2 Cultivo

El cultivo de microalgas es un sistema biológico eficiente de utilización de la energía solar para producir materia orgánica, dado que las microalgas crecen más rápido que las plantas terrestres y es posible obtener mayores rendimientos anuales de biomasa. Un cultivo de microalgas tiene tres componentes primarios: el medio de cultivo formulado con los nutrientes adecuados; las células del inóculo que crecen en dicho medio; y el aire que permite el intercambio de dióxido de carbono entre el medio y la atmósfera. Para microalgas cultivadas en condiciones autotróficas, todo lo que se necesita para el crecimiento, es luz, agua, dióxido de carbono, nutrientes y oligoelementos; ya que, a través de la fotosíntesis, serán capaces de sintetizar todos los compuestos bioquímicos requeridos para su desarrollo (Cuadro 3) (Martínez-Silva, 2010; Santos-Ballardo y col., 2015).

A pesar de ser microorganismos con una gran capacidad de adaptación a los diferentes entornos, cuando se desea realizar su cultivo bajo condiciones controladas de laboratorio, es necesario cuidar ciertos parámetros y condiciones considerando siempre los requerimientos particulares de la especie que se vaya a cultivar; además, es importante tener clara la finalidad del cultivo, ya que a través de las variaciones en los parámetros y condiciones de éste, se logra la estimulación o inhibición de la biosíntesis de numerosos nutrientes o compuestos bioactivos (Hu, 2004; Gouveia y col., 2010). De forma general, se puede hacer referencia a las ventajas de utilizar la biotecnología para la

Cuadro 3. Principales requerimientos de los cultivos de microalgales

	Requerimientos	Compuestos Químicos	Valores
Físicos	Luz	---	2000-4000 luxes
	Temperatura	---	15-22°C
	Salinidad	---	0.37%
	pH	---	7-9
Nutricionales	C	CO ₂ CO ₃	g/100 ml
	O, H	O ₂ H ₂ O	g/100 ml
	N	N ₂ NH ₄ ⁺ NO ₃	g/100 ml
	P	PO ₄ ⁻	g/100 ml
	S	SO ₄ ⁻	g/100 ml
	Na, K, Ca, Mg	Sales	g/100 ml
	Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	g/100 ml	mg/100 ml
	Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al	Sales	µg/100 ml
	Vitaminas	B ₁₂ , tiamina, biotina	µg/100 ml

Tomado de Hu (2004).

s producción de microalgas, ya que es posible emplear cultivos continuos, por lo que hay una producción importante de biomasa por área. Más de 40 especies diferentes de microalgas han sido aisladas de diversos lugares del mundo y han sido cultivadas intensamente en sistemas biotecnológicos (German-Báez y col., 2017)

Las microalgas contienen poco material estructural y alto contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos y vitaminas, además de ser inocuas y comestibles. Muchas especies de microalgas pueden crecer en aguas hipersalinas, lo que permite el aprovechamiento de zonas semiáridas u oceánicas, con alta radiación solar, no útiles para otros fines, y con la ventaja de requerir menos nutrientes que los cultivos tradicionales (Gomez, 2007; Verma y col., 2010). Así, son más eficientes que las plantas oleaginosas en la captura de energía solar, pudiendo llegar a alcanzar rendimientos fotosintéticos muy altos (hasta el 5%) con una organización celular más simple (Ruiz-Ortega, 2012). Además, la productividad de biomasa es notablemente superior a la de los cultivos agrícolas convencionales, del orden de 50 a 200 toneladas (peso seco) por hectárea al año. Los requerimientos para su crecimiento como luz, azúcares, dióxido de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio son bajos y tienen alta capacidad para producir sustancias como lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades y en cortos periodos de tiempo (Brennan y Owende, 2010).

a Características del crecimiento microalgal

Una curva típica de crecimiento celular microalgal está compuesta por cinco fases, tal como se muestra en la Figura 2; las cuales se definen por el número de células presentes en un tiempo determinado, dado por las condiciones generales del cultivo, según lo describe Cáceres-Aravena (2009), estas fases son:

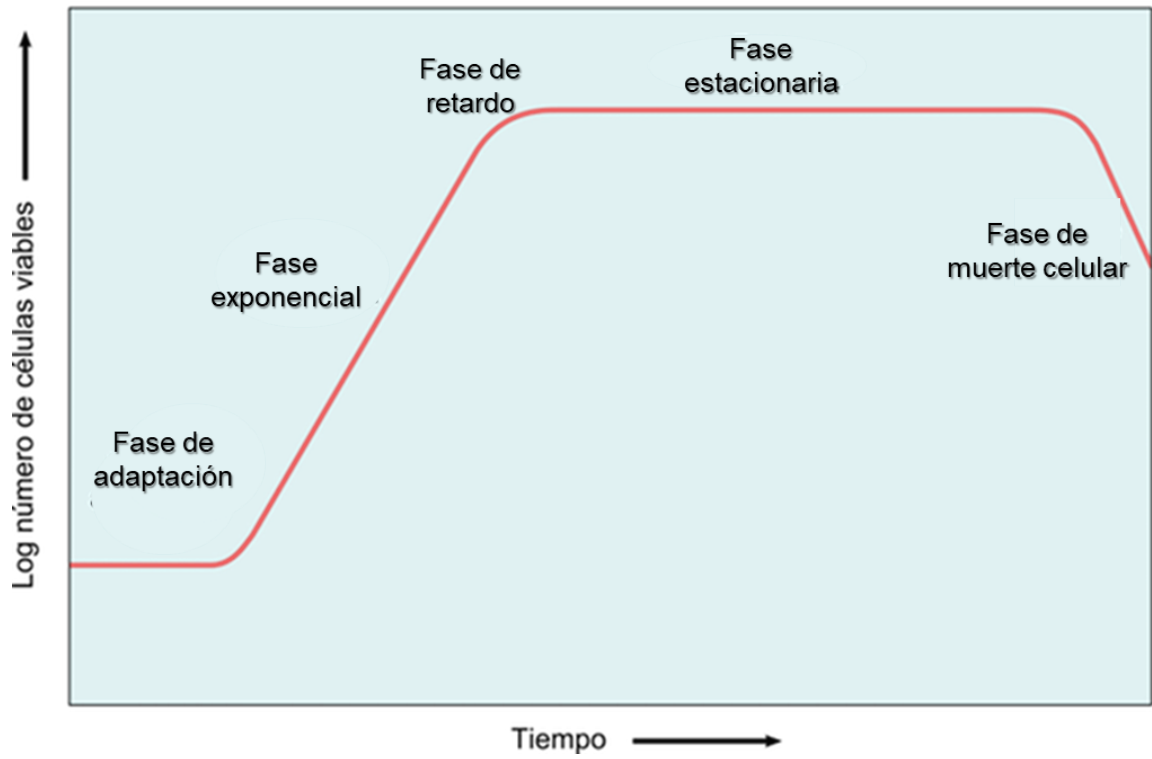


Figura 2. Comportamiento típico de una curva de crecimiento microalgal.
Tomada de Tortora y col. (2007).

- De adaptación o latencia: las células se adaptan a las nuevas condiciones de cultivo.
- Exponencial: la división celular se incrementa en función del tiempo, debido a la asimilación de nutrientes desde el medio y a su activo proceso de reproducción.
- De retardo: la tasa de crecimiento se reduce, por lo que el tiempo para duplicar la población aumenta.
- Estacionaria: el factor limitante y la tasa de crecimiento están equilibrados, por lo que las densidades celulares se mantienen constantes.
- De muerte o de declinación: la tasa de crecimiento es superada por la tasa de mortalidad de la población.

3 Usos y aplicaciones

Las microalgas son organismos que presentan una gran variedad de aplicaciones, en agricultura son utilizadas adicionándolas a los suelos de cultivo, ya que promueven la recirculación y biodisponibilidad de elementos importantes como el fósforo; además, su biomasa puede ser convertida en biocarbón o carbón vegetal, el cual se emplea como biofertilizante de alto potencial (Brennan y Owende, 2010; Singh y col., 2011). La biomasa microalgal, o bien algunos compuestos producidos por ellas, como los ácidos grasos y los triacilglicéridos, son empleados también en la industria energética para la producción de los llamados biocombustibles, como el biodiesel, bioetanol, biohidrógeno y biogás; todos ellos producidos de manera económica y sostenible (Chisti, 2007; Seefeldt, 2007). Las microalgas también se emplean en el tratamiento de aguas residuales, desintoxicación biológica y control de metales pesados en aguas naturales o en aguas industrialmente contaminadas, ya que, través de su metabolismo, las microalgas pueden eliminar distintos elementos como nitrógeno y fósforo (Mohamed, 2007; De-Bashan y Bashan, 2010; Pittman y col., 2011).

Algunas microalgas son utilizadas como agente activo, por adición de sus extractos preparados cosméticos con acción tonificante, limpiadora, antiarrugas, hidratante, desecante o antioxidante (Stolz y Obermayer, 2005).

La biotecnología microalgal comprende la obtención de una serie de productos entre los que se incluyen alimentos saludables, productos químicos industriales, cosméticos y farmacéuticos, además de compuestos con aplicaciones terapéuticas (Raja y col., 2008; Norzagaray-Valenzuela y col., 2017). Entre los productos de interés industrial que se pueden obtener a partir de microalgas se encuentran pigmentos, lípidos, polisacáridos, vitaminas, etc. Estos pueden acumularse como parte de la biomasa microalgal o en algunos casos, liberarse al medio externo (Arredondo-Vega y Vortolina, 2007). Recientemente, investigadores y emprendedores han comenzado a utilizar las microalgas como una valiosa herramienta para la ingeniería genética para la producción de proteínas recombinantes (Norzagaray-Valenzuela y col., 2018).

En la industria alimentaria, las microalgas se han estado utilizando como ingredientes para incrementar el contenido nutricional de alimentos preparados, debido a la gran variedad de compuestos bioactivos derivados de estas, constituyendo un mercado bien establecido tanto en alimentación humana como animal (Borowitzka, 2013). Son clasificadas como Sustancias Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS, por sus siglas en inglés), lo que indica que sus productos pueden ser directamente utilizados como polvo o secadas en frío con poca o nulo proceso de purificación para su uso industrial (Norzagaray-Valenzuela y col., 2018). Por lo tanto, son utilizadas durante el procesamiento de alimentos, como emulsificantes, emolientes, espesantes, aceites, grasas y colorantes naturales (Becker, 2004). Actualmente, las microalgas para consumo humano se presentan en el mercado en diferentes formatos comerciales como tabletas, cápsulas y líquidos, también se encuentran incorporadas a pastas, aperitivos, bebidas, golosinas o chicles (Liang y col., 2004). En el Cuadro 4 se presentan, los productos y aplicaciones biotecnológicas de algunas microalgas.

Cuadro 4. Aplicaciones biotecnológicas de algunas especies de microalgas

Especie/ Grupo	Producto	Área de aplicación
<i>Chlorella Vulgaris/ Chlorophyta</i>	Biomasa	Alimentos saludables, suplementos, sustitutos alimenticios.
<i>Dunaliella Salina/ Chlorophyta</i>	Carotenoides, β -caroteno	Alimentos saludables, suplementos alimenticios.
<i>Dunaliella tertiolecta/ Chlorophyta</i>	Clorofila a y b, β -caroteno	Alimentos saludables, farmacéuticos, aditivos alimentarios.
<i>Haematococcus Pluvialis/ Chlorophyta</i>	Carotenoides, astaxantina	Alimentos saludables, farmacéuticos, aditivos alimentarios.
<i>Odontella aurita/ Bacillariophyta</i>	Ácidos grasos	Farmacéuticos, cosméticos, alimento infantil.
<i>Porphyridium cruentum/ Rodophyta</i>	Polisacáridos	Farmacéuticos, cosméticos, nutrición
<i>Isochrysis galbana/ Chlorophyta</i>	Ácidos grasos	Nutrición animal, piensos
<i>Phaedactylum tricornotum/ Bacillariohyta</i>	Lípidos, ácidos grasos	Nutrición, biocombustibles.
<i>Lyngbya majuscule/ Cyanobacteria</i>	Moduladores inmunes	Farmacéuticos, nutrición
<i>Spirulina Plantensis/ Cyanobacteria</i>	Ficocianina, biomasa	Alimentos saludables, cosméticos

Tomado de Pulz y Gross (2004) con modificaciones de Kent y col. (2015).

En cuanto a la nutrición animal, las microalgas constituyen la principal fuente de alimento utilizada en la nutrición de moluscos, rotíferos y fases larvianas de crustáceos, siendo además utilizadas como complemento en las dietas de peces, o como medio para mantener la calidad del agua. Así como comida viva para la alimentación de filtros marinos dependiendo de la etapa de crecimiento de las especies en acuicultura (Santos-Ballardo y col., 2015)

4 *Porphyridium cruentum*

Porphyridium cruentum (*P. cruentum*) es una microalga que pertenece al grupo de las algas rojas, el cual es extremadamente diverso, con más de 400 géneros y 4000 especies. Morfológicamente conforman un amplio grupo, desde organismos unicelulares hasta plantas superiores, son predominantemente organismos marinos y se encuentran tanto en aguas tropicales como en aguas frías; son los únicos organismos eucarióticos fotosintéticos en la evolución de las algas que contienen ficobilisomas en sus membranas tilacoidales (Long-Sheng y col., 2017). Las microalgas rojas como *P. cruentum* o *Rhodella reticulata* pueden crecer fácilmente en cultivos puros, en grandes cantidades en el laboratorio (Ruiz-Ortega, 2012).

Estructuralmente, *P. Cruentum* tiene un plástido estrellado, un pirenoide central prominente y se encuentra aislada o en colonias irregulares con una matriz mucilaginosa no definida. Las células tienen organelos restringidos en una pequeña parte del citoplasma alrededor del plástido. La reproducción asexual ocurre por división mitótica; las colonias forman un recubrimiento gelatinoso sobre superficies en ambientes marinos y de agua dulce, así como en suelos húmedos, la especie se distingue por su color rojo característico (Gantt y Conti, 1965), el cual se debe a la presencia de dos pigmentos accesorios, la betaficoeritrina (BPE) y la ficocianina (FC), además de poseer carotenoides y clorofila a. Estos pigmentos tienen la función de ser una especie de antena, cuya

labor es atrapar a los fotones necesarios para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis (Rivera-Talamantes, 2014).

P. cruentum crece preferentemente en agua salada, aunque también posee capacidad para crecer en agua dulce. Es una microalga unicelular de forma esférica u ovoide de 6 a 16 micrómetros de diámetro (Figura 3), posee una pared celular con polisacáridos sulfatados, además produce polisacáridos extracelulares pero, durante su crecimiento, estos exopolisacáridos se disuelven en el medio (Figura 4) (Bernaerts, 2018).

a Composición bioquímica de la biomasa celular

La biomasa seca de *P. cruentum* está compuesta principalmente por carbohidratos (32.1%), proteínas (34.1%), cenizas (20%) y lípidos (7%). Además, contiene carotenos, vitaminas, y elementos como el Sodio, Potasio, Magnesio, Hierro, Cobre, Zinc, Cromo, Manganeso y Cobalto (Fuentes y col., 2000). Dentro de las proteínas presentes en esta microalga, las ficobiliproteínas se encuentran en mayor proporción, representando más de la mitad del total de las proteínas bajo condiciones óptimas de crecimiento (Long-Zheng y col., 2017). En cuanto a los lípidos que acumula, están presentes especialmente el ácido araquidónico (AA, 20:4 ω), el cual llega a representar hasta el 36% del total de ácidos grasos, así como cantidades importantes de ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5 ω) (Fuentes y col., 2000). Esta microalga roja, es también una fuente de bioproductos que poseen valor nutricional y terapéutico, incluyendo polisacáridos con actividad antiinflamatoria y antiviral, ácidos grasos de cadena larga, carotenoides (como zeaxantina) y ficobiliproteínas fluorescentes (Dufossé y col., 2005). *Porphyridium cruentum* ha sido reconocida como una excelente fuente de carrágenos, objetivo para el cual se han establecido, en muchas ocasiones, cultivos de esta especie microalgal (Golueke, 1961).

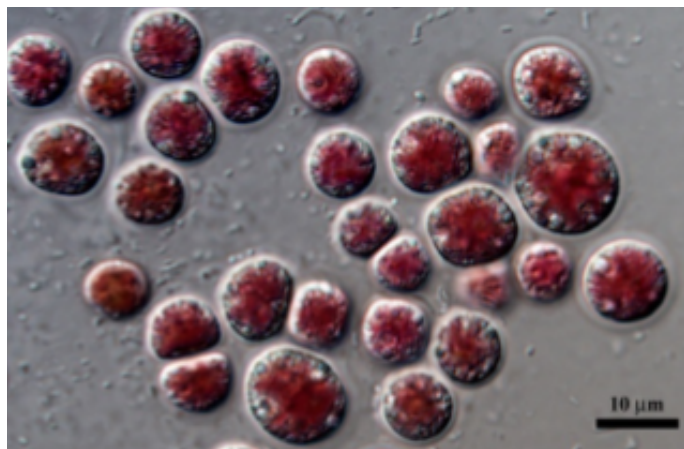


Figura 3. Imagen al microscopio de células del género *Porphyridium*.
Tomada de Rivera-Talamantes (2014).

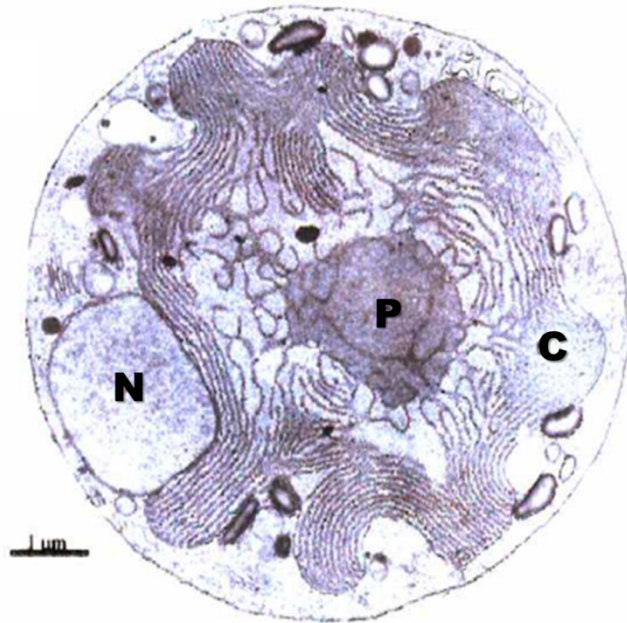


Figura 4. Aspecto general de la microalga roja unicelular *Porphyridium*. Donde C, es el cloroplasto con una sola membrana y tilacoides aislados; N, es el núcleo; P, es un pirenoide central. Adaptada de Bold y Wynne (1985).

Así pues, entre los productos obtenidos actualmente, y que tienen aplicación industrial, se encuentran los polisacáridos; en este sentido, las especies *P. cruentum* y *P. aeruginum* son las principales microalgas rojas que, bajo condiciones específicas de crecimiento, pueden producir cantidades importantes de polisacáridos extracelulares, constituidos principalmente por los monómeros D-glucosa, D- y L-galactosa, 3-0-metilxilosa, 3- y 4-0-metilgalactosa y ácido D-glucurónico (Richmond, 2004).

Su competencia la encuentran en las macroalgas que sintetizan polisacáridos, principalmente alginatos, carragenatos, agarosa, así como en ciertas bacterias y hongos; la particularidad desde el punto de vista químico, de los polisacáridos producidos por *Porphyridium* es que están sulfatados, como los carragenatos, compuestos de xilosa y glucosa así como de galactosa, por lo que son considerados efectivos antiinflamatorios para uso tópico (Matsui y col., 2003). Estos exopolisacáridos han mostrado gran potencial en la aplicación industrial por sus propiedades reológicas, que pueden ser comparables con gomas tipo xantana; además, estas propiedades son estables en un amplio rango de pH's (2-9) y temperaturas (30-60°C) (Arad y col., 2006; Bernaerts, 2018).

Entre los productos obtenidos de *P. Cruentum* el de mayor impacto en la actualidad es la BPE, que ha mostrado ser particularmente útil por su gran coeficiente de absorción y sus excelentes propiedades de fluorescencia. La BPE está en una región espectral que normalmente es distinto de la región de emisión de los tintes orgánicos simples, usados comúnmente como indicadores fluorescentes, por lo que este pigmento es un valioso candidato como biosensor y como colorante para la industria alimentaria.

C FICOBILIPROTEÍNAS

Las ficobiliproteínas, también llamadas biliproteínas, son macromoléculas biológicas con grupos prostéticos tetrapirrólicos lineales, denominados bilinas, que están enlazados covalentemente a la cadena de la apoproteína mediante

enlaces específicos en los residuos de cisteína; son hidrosolubles y forman complejos antena denominados ficobilisomas, estos últimos son de forma esférica y tienen aproximadamente 600 nm de diámetro, con una masa de alrededor de los 2500 kDa, se encuentran unidos a la cara externa de la membrana tilacoidal y actúan como antenas que captan la luz canalizando la energía de excitación. Las biliproteínas constituyen el 85% de la masa del ficobilisoma y se organizan en orden de su máxima absorción, encontrando a las ficoeritrinas en la periferia, ficocianinas en el centro y aloficocianinas muy cerca de los centros de reacción en la membrana tilacoidal (Figura 5) (Yamanaka y col., 1980; Patterson, 1996, Ruiz-Ortega, 2012). Por lo tanto, la ruta de transferencia de la energía dentro de la célula es:

Ficoeritrina → Ficocianina → Aloficocianina → Clorofila

Las biliproteínas están principalmente formadas por discos hexaméricos y triméricos de bilinas, en la Figura 6 se presenta un esquema del modelo de rizos en la estructura de ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina (trímero).

De esta manera, las biliproteínas se pueden dividir en cuatro grupos principales: las ficoeritrinas, que son biliproteínas rojas cuyos cromóforos son la ficoeritrobilina y la ficourobilina, poseen dos o tres bilinas en la subunidad α y tres en la subunidad β , presentando máximos de absorción entre 540 y 570 nm; las ficocianinas, son proteínas azules cuyo cromóforo es la ficocianobilina, también posee ficoeritrobina y sus máximos se encuentran entre 610 y 620 nm; las L-aloficocianinas, son biliproteínas de color verde-azulado, cuyo cromóforo es la ficocianobilina que se encuentra en la subunidad α y otro cromóforo en la subunidad β , su máximo de absorción se encuentra entre los 650 y los 655 nm; finalmente se encuentran las ficoeritrocianinas, cuyos máximos están entre los 570 y 595 nm y van del morado al azul intenso (Ruiz-Ortega, 2012).

Las bilinas, por su parte, están formadas por tetrapirroles lineales que contienen

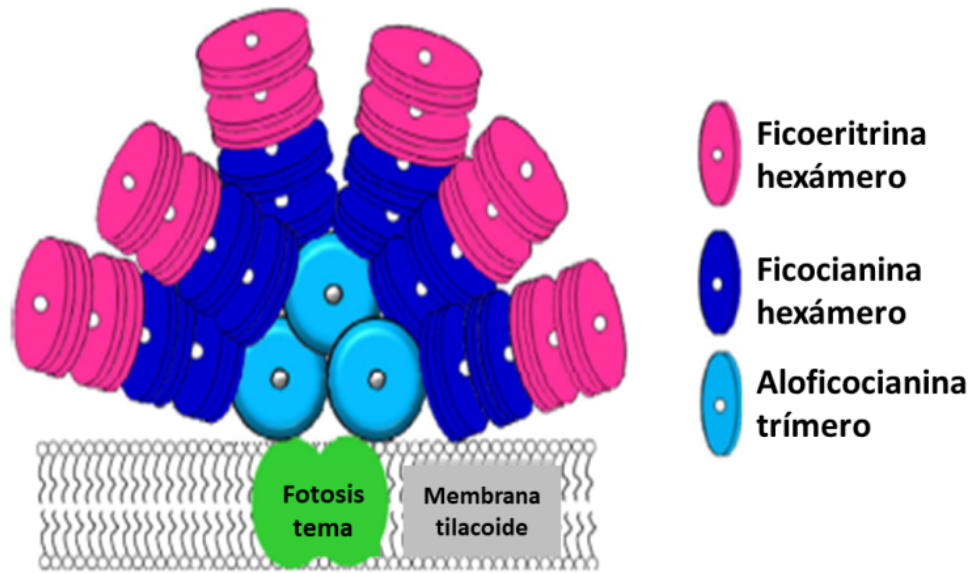


Figura 5. Ficobilisoma situado en la membrana tilacoide. Tomada y adaptada de Sonani y col. (2016).

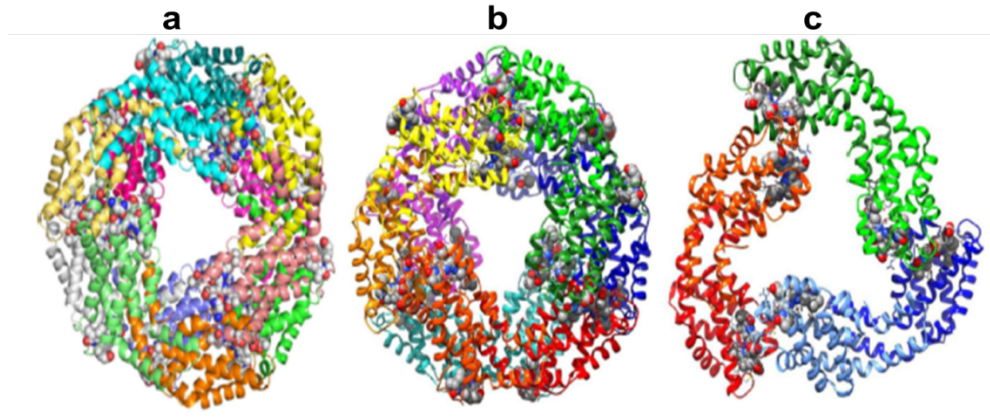


Figura 6. Modelo de rizados de hexámero. a, ficeeritrina; b, ficocianina; c, aloficocianina. Tomado de Sonani y col. (2016).

4 anillos pirrólicos A, B, C y D conectados por carbono (Figura 7). Cada anillo A y D, contiene un átomo de oxígeno, mientras que los anillos del medio, B y C, están asociados a residuos de ácido propiónico, en comparación con los grupos hemo y las clorofilas, las bilinas no contienen átomos de metal 23 y 25, y presentan un peso molecular cercano a los 600 kDa (Glazer y col., 1999; Stadnichuk y Tropin, 2016). Se han sugerido diferentes rutas de biosíntesis de las bilinas, incluyendo ácido δ -aminolevulínico, grupos hemo o biliverdina como precursores, tal como se muestra en la Figura 7 (Cuellar-Bermudez y col., 2014). Estos cromóforos les confieren a las ficobiliproteínas altos coeficientes de extinción en una zona amplia del espectro electromagnético, lo que, unido a su alto rendimiento cuántico, proporcionan excelentes propiedades fluorescentes. Las propiedades espectroscópicas de las ficobiliproteínas dependen de su estructura y del número de bilinas que contienen, del ambiente protéico que rodea a estos cromóforos y de las relaciones estéricas entre ellos (Ong y col., 1984). Las ficobiliproteínas pueden constituir más del 60% de las proteínas solubles en agua presentes en las cianobacterias, o el 20% del peso de la célula seca; también las podemos encontrar en cantidades elevadas en algas marinas de la clase *Rhodophyceae*, *Cyanophyceae*, *Cryptophyceae* y algunas *Pirrophyceae*.

Entre estas clases de algas y microalgas rojas se encuentra *P. cruentum* (Borowitzka, 2013; Stadnichuk y Tropin, 2016). Esta microalga ha demostrado ser eficiente en la producción de ficoeritrina, ya que esta proteína representa aproximadamente el 1.66 % peso seco de la microalga (Bermejo, 2002). La ficoeritrina es un importante pigmento para la captación de luz de las microalgas rojas (Basaca-Loya, 2009).

Usos de las ficobiliproteínas

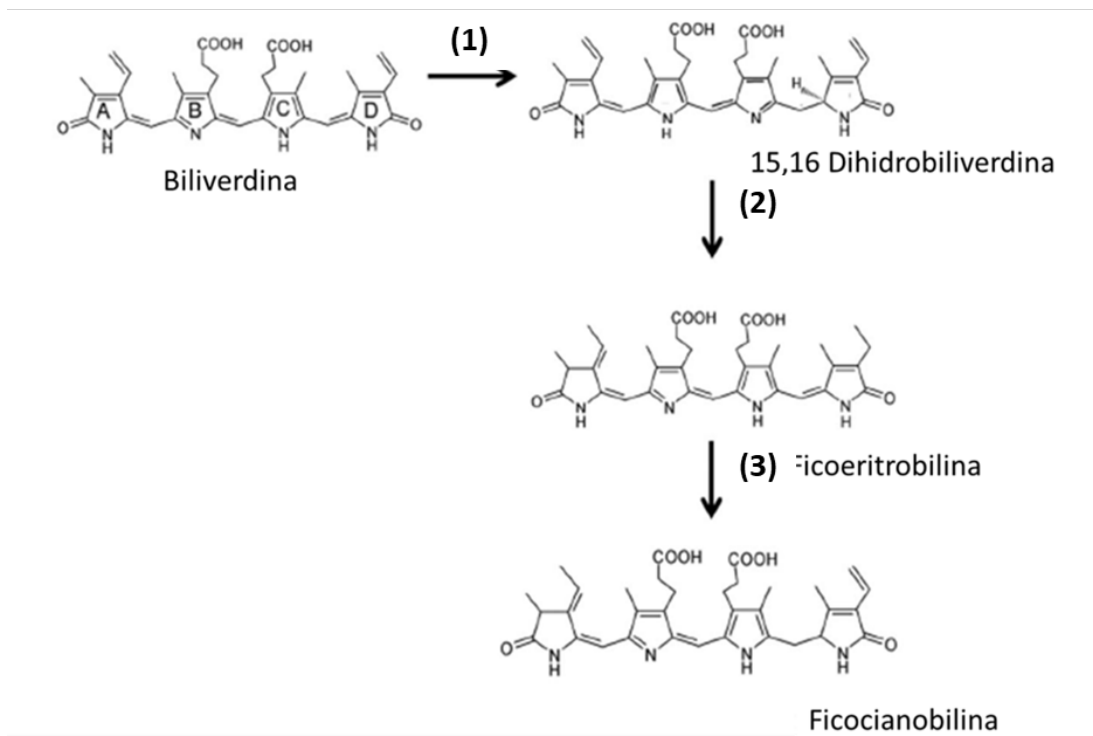


Figura 7. Ruta de biosíntesis de ficobilinas a partir de Biliverdina. Las reacciones son: (1) Biliverdina 15-16-reductasa, (2) Bilina 2,3-reductasa (3) Ficobilina (15,16 metileno a 18,18 etil-isomerasa. Tomado de Cuellar-Bermúdez (2014).

Los colores que presentan las ficobiliproteínas se asocian fácilmente con el mundo natural, así, las ficoeritrinas son de colores rosas y rojizos; las ficocianinas y ficoeritrocianinas van del morado al azul intenso; y las aloficocianinas poseen un color característico verde-azulado.

Por ello, estas macromoléculas poseen un enorme potencial como colorantes naturales, pudiendo reemplazar a los colorantes sintéticos y constituyendo una alternativa real para el incremento y diversificación de la oferta actual de colorantes naturales existentes en el mercado (Ruiz-Ortega, 2012). C-ficocianina es usada como colorante alimentario y como pigmento para cosméticos al igual que R-ficoeritrina, que es usado como colorante en alimentos tales como en productos lácteos, helados, postres, licuados, así como en cosméticos (Sekar y Chandramohan, 2008).

Las ficobiliproteínas también son utilizadas en ensayos inmunológicos, ya que, sustituyen con ventajas a la fluoresceína, la cual, a pesar de ser el colorante más utilizado como marcador bioquímico y biológico, presenta algunos inconvenientes en la disminución de la solubilidad en agua de las proteínas a las que etiqueta, y tiene una tendencia a unirse inespecíficamente a otras sustancias; además, la fluorescencia de esta sustancia es producida de manera endógena por algunos componentes naturales presentes en los fluidos y tejidos biológicos, lo que provoca la falta de especificidad en la señal fluorescente. En cambio, las ficobiliproteínas fluorescen con un alto rendimiento cuántico; producen una fluorescencia anaranjada fácil de diferenciar, su emisión no se altera en márgenes amplios de temperatura y pH, son muy solubles en agua, y debido a su estabilidad, se pueden almacenar durante meses. Por estas propiedades, las ficobiliproteínas pueden ser catalogadas como inmejorables marcadores fluorescentes, útiles en diferentes técnicas de estudio, diagnóstico, e investigación biomédica, como inmunofluorescencia, citometría de flujo, ensayos de microplacas fluorimétricos, entre otros (Glazer, 1994; Spolaore y col., 2006; Sun y col., 2006; Eriksen, 2008; Ruiz-Ortega, 2012; Juin y col., 2014).

Las ficobiliproteínas pueden conjugarse fácilmente con una gran cantidad de moléculas para formar combinados denominados, según Glazer y Stryer (1984), como “phycofluors”, estos se forman mediante reacciones entre los grupos NH_2 de sus abundantes cadenas laterales de lisina. Se han obtenido conjugados de este tipo por medio de la unión de ficobiliproteínas con inmonoglobulinas y avidina (Zhou y col., 2010). También moléculas pequeñas, como la biotina, se pueden unir a las ficobiliproteínas por reacción con un activador apropiado de la molécula pequeña. Incluso se han obtenido conjugados entre diferentes ficobiliproteínas.

Las ficobiliproteínas también han demostrado poseer valor terapéutico debido a su efecto protector y su actividad carcinogénica (González y col., 1999; Bei y col., 2002), actividad antioxidante y antiinflamatoria (Bhat y Madyastha., 2000; Benedetti y col., 2006;) y su valor para el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson (Rimbau y col., 2001.) Las ficocianinas y ficoeritrinas se están empleando en la actualidad en la obtención de nanopartículas biológicas bifuncionales, con posibles aplicaciones en los ámbitos biomédico y fotoquímico (Bermejo y col., 2011).

Como se ha venido mencionando, las ficobiliproteínas se caracterizan por poseer un anillo tetrapirrólico unido covalentemente a su estructura, este pigmento puede ser ficocianobilina (algas verde-azules) o ficoeritobilina (algas rojas), y es parcialmente responsable de las propiedades asociadas a estas ficobiliproteínas, tratándose mayormente de propiedades hepatoprotectoras, antiinflamatorias y actividad antioxidante (Bhat y Madyastha, 2000; Romay y col., 2003).

Debido a sus propiedades no tóxicas y anticarcinogénicas, las ficobiliproteínas han sido también utilizadas como colorantes en la industria alimentaria, especialmente en bebidas y dulces (Pandey y col., 2013). Con acciones antioxidantes y estabilizantes de color, además, para la mejora las propiedades reológicas y para prolongar la vida útil del producto (Batista y col., 2006). Además, las ficobiliproteínas son usadas en cosméticos, para la elaboración de lápices

labiales y delineadores de ojos en Japón, Tailandia y China (Bermejo y col., 2001). Como agentes nutracéuticos y en estudios oceanográficos como marcadores quimiotaxonómicos (Spolaore y col., 2006; Eriksen, 2008; Juin y col., 2014).

2 Ficoeritrina

La ficoeritrina (PE) es la más abundante de las ficobiliproteínas en las algas y microalgas rojas y en algunas cianobacterias, contiene dos cromóforos de bilinas, ficourobilina (PUB) y ficoeritrobilina (PEB) (Figura 8). Estructuralmente, la PE presenta complejos hexaméricos muy estables en forma de discos de 12 nm de diámetro y 6 nm de altura, cada hexámero tiene 34 bilinas (Schoenleber y col., 1984; Glazer, 1994). El espectro de absorción de esta proteína tiene picos de 480 nm y 570 nm, y puede ser dividida en tres clases principales, dependiendo de su espectro de absorción y de su origen: β -ficoeritrina (BPE), comúnmente encontrada en microalgas, con crestas que se observan a 545, 565 nm, con un surco a 499; R-ficoeritrina, abundante en algas rojas, con crestas a 499, 565 nm y un surco a 545; y finalmente, la C-ficoeritrina aislada de cianobacterias, en la que se observa una sola cresta a los 565 nm. Los pesos moleculares de las subunidades de PE varían según el organismo de donde provengan (Galland, 2000; Lu-Ning y col., 2005; Hemlata y col., 2018).

La BPE presenta múltiples subunidades, la α y β consisten de una cadena abierta de tetrapirroles que constituyen a los cromóforos, éstas presentan pesos

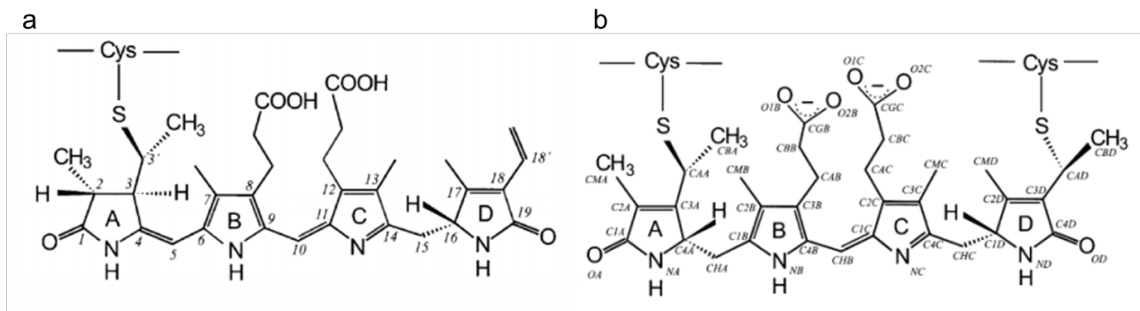


Figura 8. Estructuras de las subunidades de bilina presentes en la ficoeritrina. Se encuentran como grupos prostéticos de la ficoeritrina de cianobacterias, algas y microalgas rojas, unidas mediante enlaces covalentes a residuos de cisteína. a, Cys-PUB, Cisteína-Ficourobilina; b, Cys-PEB, Cisteína-Ficoeritrobilina. Tomada de Bacarizo-Roa (2012).

moleculares de 17.82 KDa y 18.55 KDa, respectivamente; y una tercera subunidad, la γ , con una masa molecular aparente de 30 a 33 kDa (Figura 9). La subunidad α contiene dos o tres PEBs, unidas mediante enlaces covalentes a residuos de cisteína 82 y 139; mientras que la subunidad β contiene tres PEBs, una está enlazada a Cys82, otra a Cys158 y la otra esta enlazada a Cys50 y Cys61 (Schoenleber y col., 1984). En contraste, en la subunidad γ se estiman 4 subunidades de bilinas, dos PEBs y dos PUBs (Glazer, 1976).

Los protómeros $\alpha\beta$ (referidos como monómeros) pueden luego formar agregados de forma triangular llamados trímeros (heterohexámeros) y hexámeros (heterododecámeros), que constituyen los bloques que forman los ficobilisomas de los pigmentos antena anclados a las membranas tilacoides (Roy y col., 2011).

Fisiológicamente, la BPE es considerada como un complejo macromolecular compuesto de tres hexámeros $[(\alpha\beta)_2]$ y un polipéptido γ . Las interacciones inter e intramoleculares presentan un rol con el complejo, y son cruciales para la función de la BPE en la transmisión de la luz. La densidad residual del electrón en datos cristalográficos, ha sugerido que la subunidad γ esta localizada en el centro de los hexámeros $[(\alpha\beta)_2]_3$ por lo que, debido a la rotación, no se han obtenido datos estructurales de γ , y solo ha sido posible su obtención (Camara-Artiga y col., 2012).

a Usos y aplicaciones de la BPE

En cuanto a sus aplicaciones actuales, la BPE es usada como indicador en ensayos cuantitativos, porque ha mostrado ser particularmente útil por su gran coeficiente de absorción y excelentes propiedades de fluorescencia. Se considera el fluoróforo natural más brillante, ya que es 10 veces más brillante e intenso que los mejores colorantes orgánicos; está en una región espectral que normalmente es distinta de la región de emisión de los tintes orgánicos simples

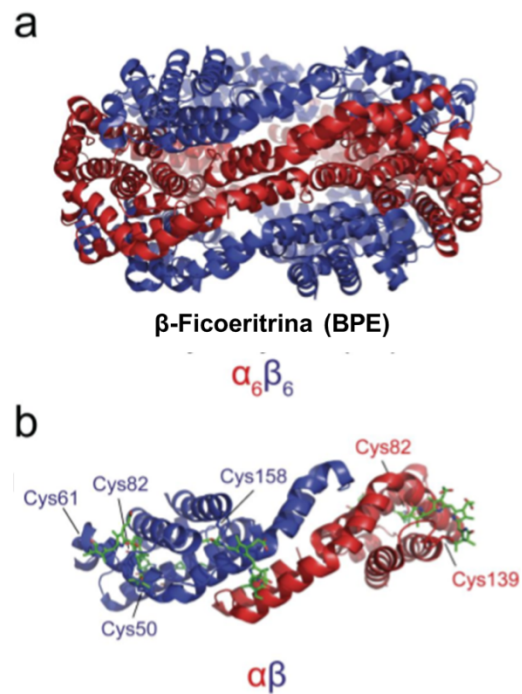


Figura 9. Estructura del complejo proteico de la β -ficoeritrina. a, Vista de $\alpha_6\beta_6$ de BPE. b, Vista del dímero $\alpha\beta$ de BPE. Las moléculas de bilina de las subunidades α y β se muestran en verde. Las subunidades α y β se observan en rojo y azul, respectivamente. Tomada de Leney y col. (2018).

usados como indicadores fluorescentes, por consiguiente, el pigmento es un valioso candidato como biosensor (Manirafasha, 2016). La BPE está en una región espectral que normalmente es distinto de la región de emisión de los tintes orgánicos simples usados como indicadores fluorescentes; las empresas americanas Biomeda Corp. y Cyanotech Corp., comercializan la ficoeritrina de *Porphyridium* como marcadores fluorescentes a varios miles de dólares el Kg (Vonshak, 1988; Cisneros-Ruiz y Rito-Palomares, 2005)

La BPE también ha sido empleada para la obtención de anticuerpos murinos consiguiendo una calidad superior para su uso en inmunoensayos (Fernández-Duarte y col., 2017).

Por su capacidad de absorber radicales de oxígeno de α -tocoferol, vitamina C, β -caroteno, ácido úrico y bilirrubina en suero, es altamente sensible en la medición física y química de antioxidantes, por lo que puede ser empleada en inmunoensayos y por supuesto como colorante, ya que es altamente soluble en agua y está negativamente cargada a pH fisiológico, permitiendo uniones no específicas debido a que las células están también cargadas negativamente (Cao y col., 1993).

Asimismo se destaca su uso como colorante en la industria alimentaria, que va desde los productos lácteos, hasta diversos productos de confitería (dulces y gomas de máscar), entre otros (Benavides y Rito-Palomares, 2005). En cosmetología la BPE es empleada en la fabricación de lápices labiales, así como delineadores de ojos, en países como Japón, Tailandia y China (Bermejo y col., 2001).

b Propiedades funcionales

Diversos autores han demostrado la funcionalidad de la BPE. Sonani y col. (2014) reportaron su actividad antioxidante y antienvjecimiento; además de su

potencial uso en el tratamiento contra el Alzheimer de la proteína aislada de *Lygbya sp.* En su estudio se probaron diferentes dosis de BPE en las dietas tanto de células wild type y como transgénicas, de *Caenorhabditis elegans* y se evaluó su potencial antienvjecimiento, encontrando que la supervivencia de *C. Elegans* aumentaba en comparación de las que estaban bajo condiciones normales, y también moderó el decrecimiento de las funciones antiedad asociados con la locomoción de nemátodos N2. Además el tratamiento con BPE, aumentó la tolerancia al estrés de los adultos de 5 días de un 22 a un 41.6% bajo condiciones de estrés térmico, y de un 40.1 a un 63.1% bajo condiciones de estrés oxidativo. Este tratamiento también moderó la actividad de la expresión del péptido amiloid-beta ($A\beta_{1-42}$) que esta asociado con la parálisis muscular de tejidos transgénicos de *C. elegans* CL4176 (modelo de la enfermedad de Alzheimer).

Por otro lado, diversos reportes ha demostrado que la BPE presenta actividad inmunosupresora y antihipertensiva (Glazer,1994; Sekar, 2008; Fitzgerald y col., 2011; Rumay, 2015). Mientras que otros autores tales como Bei y col. (2002), al realizar ensayos con células tumorares S180 de ratón y células de carcinoma de hígado SMC 7721, en terapias fotodinámicas empleando irradiación con Argón, encontraron que las subunidades α , β y γ de BPE podrían tener un rol en mejorar la selectividad de este tipo de terapia contra el cáncer.

Najdenski y col. (2013), reportaron que la ficoeritrina de *P. Cruentum* funciona como un agente antibacterial con una concentración de 0.29 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus*.

Finalmente, las ficoeritrinas han sido empleadas para la obtención de nanopartículas biológicas bifuncionales, con posibles aplicaciones en el ámbito biomédico y fotoquímico (Bermejo y col., 2011).

c Obtención de la BPE

La extracción de las ficobiliproteínas en general, a partir de algunas especies de algas y microalgas ha sido extensivamente estudiada considerando su importancia económica. Usualmente, el método de extracción es el factor clave para la recuperación de las ficobiliproteínas; los protocolos usualmente involucran la selección de una fuente adecuada de biomasa seguida de la disrupción celular y la liberación de las proteínas. Sin embargo, existe un déficit en los estudios que buscan la obtención y purificación de proteínas de esta naturaleza a mediana y gran escala, por lo que el potencial que poseen las ficobiliproteínas no ha sido bien aprovechado debido a su escasa disponibilidad, ya que no hay métodos efectivos y sistemáticos para el aislamiento y purificación de las mismas (Patil y col., 2008; Morales y col., 2010). En términos generales existen dos etapas principales para la obtención de estos compuestos a partir de microalgas, la primera se refiere al tratamiento previo de la biomasa que genera un extracto rico en proteínas, listo para ser utilizado en una segunda etapa, la cual consiste en el refinamiento del proceso de purificación, y que normalmente utiliza métodos cromatográficos.

En el caso particular de la BPE, al igual que otras ficobilinas, esta ha sido extraída de algas, microalgas y cianobacterias, y purificada de diferentes formas que van desde la obtención de los ficobilisomas intactos, hasta los cromóforos libres de proteínas. Estas formas, por definición, tienen diferentes propiedades de absorción, fluorescencia y estabilidad química, por lo que es útil definir los procedimientos de purificación y la naturaleza de los productos bilínicos antes de discutir sus características individuales. Por ejemplo, el adecuado control de la fuerza iónica y del pH durante el proceso de extracción, garantiza la estabilidad de la asociación del polímero y sus propiedades de fluorescencia (Glazer, 1982). El color de la BPE es estable a 60°C por 30 min y tiene una vida de anaquel larga a pH 6-7. Resulta estable como un ingrediente de alimentos deshidratados y puede almacenarse a condiciones bajas de humedad (Arad y Yaron, 1992).

El valor comercial de la BPE, está dado por su pureza, la cual se define por la razón de $A_{545 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$. Una pureza de 0.7 es considerada como grado alimentario, 3.9 como grado reactivo y mayor a 4 como grado analítico (Rito-Palomares y col., 2001). Por lo que se considera 4 un producto de alta pureza y llega a tener valores comerciales por arriba de los 50 dólares por mg (Martek Corporation, 2005).

Tradicionalmente, el problema de la pureza se ha solucionado por separaciones sucesivas de las ficobiliproteínas de los pigmentos celulares asociados y de otras proteínas celulares. Este proceso se facilita por el hecho de que las ficobiliproteínas son muy solubles en agua, por lo que, después de la ruptura celular es posible separar las ficobilinas de las clorofilas y carotenoides por centrifugación del homogenizado a alta velocidad (Rowan, 1989).

La extracción de BPE se realiza de forma general a partir de una etapa de ruptura celular, extracción en agua, o en determinada solución amortiguadora y centrifugación para separar el filtrado, el cual puede ser parcialmente purificado o esterilizado por microfiltración, y finalmente liofilizado (Dufosse y col., 2005). La purificación de este tipo de biliproteínas requiere de múltiples etapas y procesos con altos costos debido a su tiempo, solventes y tediosas etapas que eventualmente disminuyen los rendimientos de extracción, y en conjunto conllevan a un elevado costo de producción (Jain y col., 2014). Por ejemplo, la purificación del sobrenadante por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico produce ficobilinas casi puras en la forma de subunidades α y β (Rowan, 1989). Sin embargo, Las similitudes químicas entre los diferentes tipos de ficobiliproteínas, hacen relativamente difícil el aislamiento de BPE por estos métodos comunes de electroforesis y cromatografía de intercambio iónico (Betancourt-Fernandez, 1997).

Aunque las metodologías convencionales para la purificación de biliproteínas constan de múltiples etapas en términos generales, existen dos etapas

principales. Iniciando con el acondicionamiento previo de la biomasa microalgal para generar un extracto crudo rico en proteínas, listo para ser utilizado en una etapa posterior basada en el refinado, que normalmente utiliza métodos cromatográficos. Uno de los estudios pioneros realizado por Glazer y Hixson (1975) sobre la purificación de la BPE, consistió en un esquema de tres pasos cromatográficos, el cual ya ha sido simplificado a dos pasos por diversos autores (Yu y col., 1981, Schoeletter y col., 1983, Bermejo y col., 2003, Rossano y col., 2003). Sin embargo, Basaca-Loya (2009) llevó a cabo una metodología de purificación que incluye la cromatografía de exclusión por tamaño e intercambio aniónico.

Las etapas y subetapas de estas metodologías en general no son escalables; además el elevado número de operaciones unitarias necesarias, incrementa los costes de producción y el tiempo necesario para optimizar la purificación (Ruiz-Ortega, 2012).

La creciente demanda y la importancia del uso de la BPE, ha llevado al estudio constante y la búsqueda de nuevas metodologías para extraer este producto de microalgas de una manera más eficiente, que pueda reducir los costos de producción, e incrementar su pureza para su potencial uso como colorante alimentario y demás aplicaciones anteriormente descritas; lo cual representa una signatura aún pendiente en cuanto a la producción sistemática de la BPE a niveles industriales; sin lo cual, el aprovechamiento de esta proteína de enorme potencial alimentario, farmacológico y cosmetológico, será prácticamente nulo.

III JUSTIFICACIÓN

La creciente demanda mundial por pigmentos naturales ha incitado a la búsqueda inminente de fuentes alternativas, principalmente basados en el esquema de la sustentabilidad, en este sentido, debido a los altos contenidos de ficobiliproteínas presentes en la microalga marina *Porphyridium cruentum*, resulta interesante establecer un sistema de producción de aislados proteínicos ricos en ficoeritrinas, a partir del establecimiento de un sistema eficiente de generación de biomasa microalgal.

IV HIPÓTESIS

A partir de un cultivo de *P. cruentum* en biorreactor cerrado, y un sistema de extracción acuosa, es posible obtener un extracto proteínico funcional rico en β -ficoeritrina con actividad antioxidante y antihipertensiva.

V OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Establecer un sistema de producción de un extracto proteínico funcional rico en ficobiliproteínas a partir de un cultivo de *Porphyridium cruentum*.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Estandarizar un protocolo para la obtención de biomasa de *P. Cruentum* con alto contenido de β -ficoeritrina.
- 2 Determinar la composición bioquímica de la biomasa microalgal obtenida.
- 3 Desarrollar un método para la obtención de un extracto proteico rico en BPE.
- 4 Caracterizar electroforéticamente el extracto proteínico obtenido.
- 5 Evaluar *in vitro* la capacidad antioxidante y antihipertensiva del extracto proteínico rico en BPE.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética de la Maestría en Biotecnología de la Facultad de ciencias Químico-Biológicas, de la Universidad Autónoma de Sinaloa. En la Figura 10 se muestra el esquema general de trabajo realizado.

A MATERIALES

1 Microalga

Para la realización de este trabajo de investigación se utilizó la microalga *Porphyridium cruentum*, la cual fue obtenida de la colección de microalgas del departamento de acuacultura del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE).

2 Medio de cultivo

El cultivo y mantenimiento de *P. cruentum* así como las cinéticas de crecimiento, se realizaron empleando el medio F/2 (Guillard y Ryther, 1962). Este es un medio de cultivo ampliamente utilizado en microalgas, el cual se compone de agua salada (3.4 % de sal), vitaminas, fosfatos, nitratos y metales traza (Anexo 1).

B MÉTODOS

1 Cultivo de *Porphyridium cruentum*

Se utilizó la técnica de transferencias sucesivas de acuerdo a la metodología propuesta por Guillard y Rhyter (1962), con algunas modificaciones, tal como se muestra en la Figura 11; se utilizó medio F/2, partiendo de un volumen inicial de 10 mL y se le añadieron 5 mL de la cepa *Porphyridium cruentum*, luego de 6

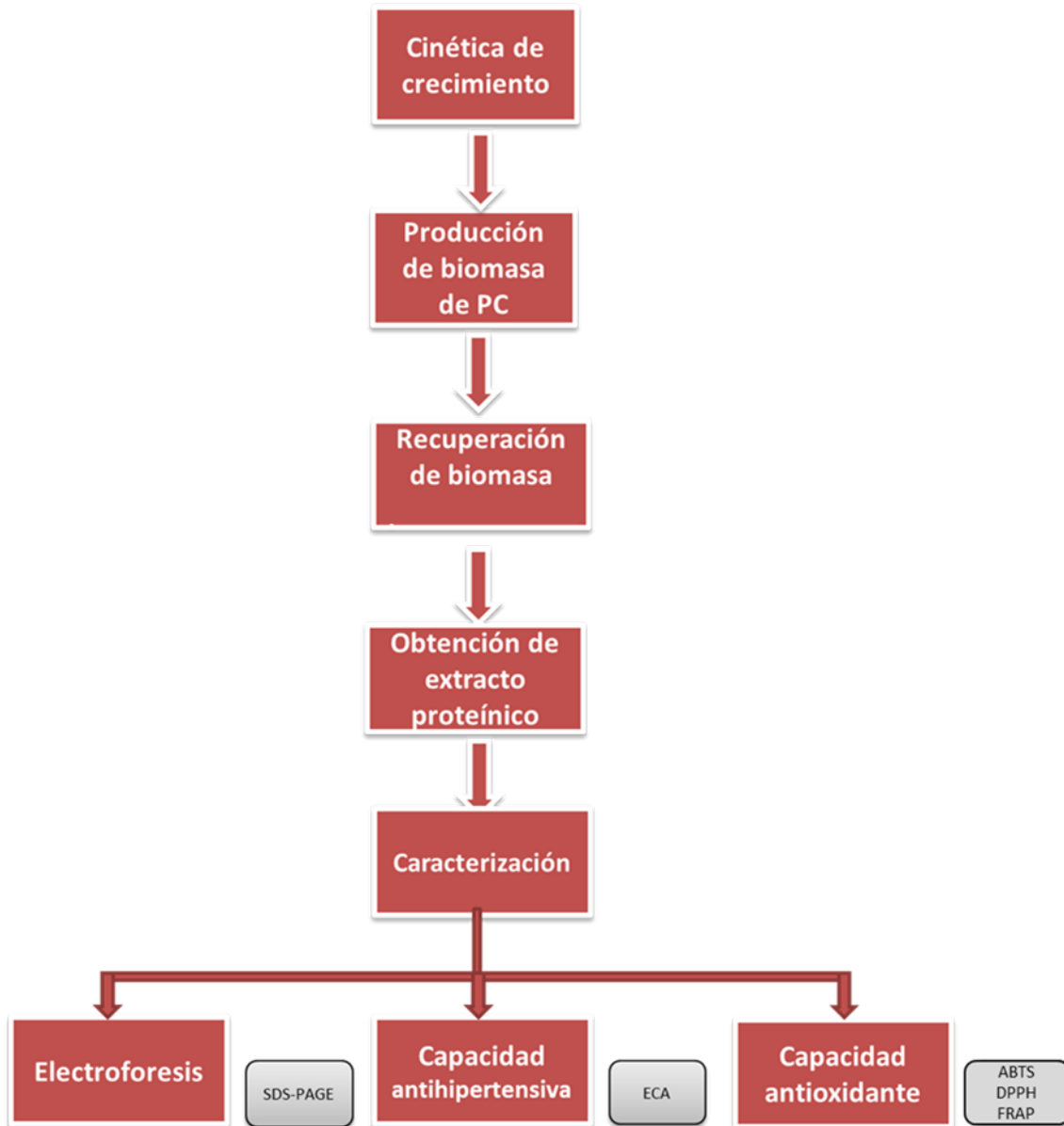


Figura 10. Esquema general de trabajo

días se transfirió este volumen a un matraz previamente esterilizado, y se le añadieron 35 mL de medio F/2; posteriormente, se realizaron escalamientos con incrementos de volumen a 500 mL y posteriormente a 3000 mL. Todos los cultivos se mantuvieron con un fotoperiodo 24:00 (luz-oscuridad), y una temperatura constante de 24°C. En el caso de la agitación y la aireación continua, en las diferentes etapas de escalamiento, estas fueron aplicadas a partir del volumen de 500 mL para lograr la incorporación de carbono inorgánico (CO₂), facilitar a todas las células el acceso a los nutrientes, así como para permitir que fueran expuestas a la misma radiación de luz.

2 Establecimiento de las cinéticas de cultivo

a Curva de densidad celular

La cinética de crecimiento del cultivo de *P. cruentum*, se realizó en un volumen final de 3000 mL inoculado a una concentración de 300,000 cel mL⁻¹, siguiendo la metodología mencionada anteriormente; el cultivo se realizó por triplicado manteniéndolo bajo condiciones de luz y temperatura constante. Para construir la curva, se realizó un monitoreo de los cultivos, mediante muestreos cada 24 horas, y se utilizó el método analítico de conteo celular con ayuda de un hematocitómetro o cámara de recuento celular de Neubauer, y un microscopio óptico (ZEISS, Alemania). Se contabilizaron el total de las células presentes en los cuatro cuadros ubicados en las esquinas de la cámara, el número obtenido se dividió entre cuatro y se multiplicó por 10,000; en caso de haber necesitado dilución, se multiplicó también por el factor de dilución empleado (Figura 1); el valor resultante se expresó como el número de células por mililitro, todos los conteos se realizaron por triplicado (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota, 2006).

Una vez construida la curva de densidad celular, fue posible calcular los parámetros que describen la eficiencia del crecimiento celular como son la tasa

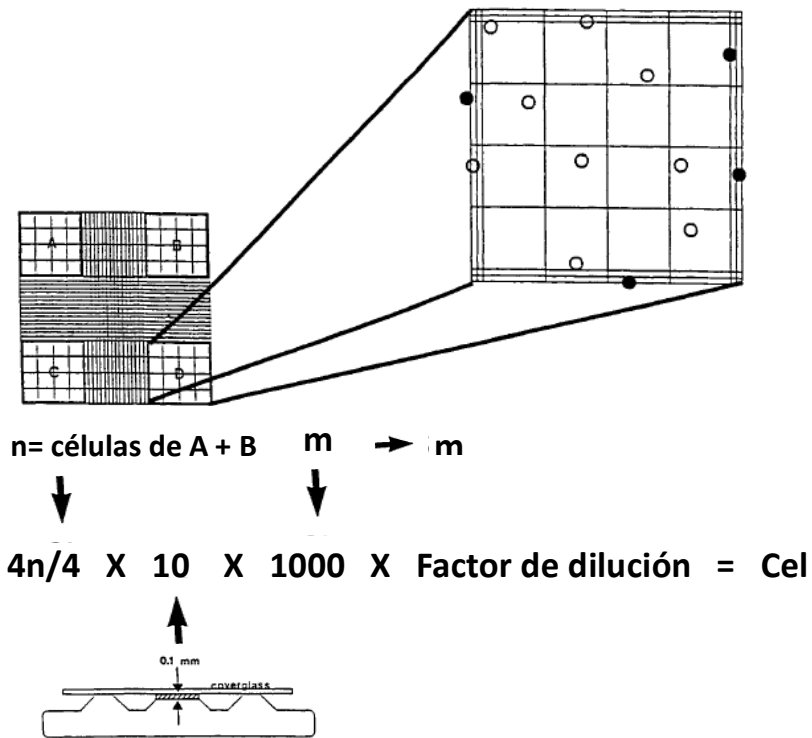


Figura 11. Cálculo del número celular utilizando el hemocitómetro. Tanto para el conteo celular como para la determinación de viabilidad por colorante de exclusión, se cuentan todas las células dentro del área limitada por las líneas triples. Adaptada de Richardson y Fedorof (2001).

de crecimiento específico (μ) y el tiempo de duplicación (dt).

1) Tasa de crecimiento específico (μ)

Se define como la tasa de aumento de la biomasa de una población celular por unidad de concentración de biomasa.

Se calculó en cultivos discontinuos, ya que durante un periodo definido de tiempo, entre las fases de latencia y estacionaria, el aumento de la población celular se ajusta a una ecuación lineal. Para obtener la μ , se tomaron los datos obtenidos de la cinética de crecimiento y se graficó el logaritmo natural del valor obtenido de la biomasa celular contra el tiempo, se eligió el rango de datos que se ajustaron a un comportamiento lineal y, se despejó μ de la ecuación obtenida del gráfico, la cual corresponde a la pendiente de la ecuación de la gráfica:

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t} \quad \text{Ec (1)}$$

Donde X_0 es la biomasa inicial, X es la biomasa al tiempo t , y μ es la tasa de crecimiento específico (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota, 2006).

2) Tiempo de duplicación (dt)

Se define como el tiempo requerido para que la concentración de la biomasa de una población de células se duplique, este parámetro se calcula a partir de los valores de μ obtenidos, empleando la siguiente ecuación:

$$dt = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Ec (2)}$$

Donde μ es la tasa de crecimiento específico (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota, 2006).

b Curva de concentración de ficobiliproteínas

Esta curva se realizó a la par de las curvas de densidad y viabilidad celular. Para la realización de la curva de concentración de las ficobiliproteínas respecto al tiempo de cultivo, se tomaron muestreos diarios y la cuantificación de las ficobiliproteínas se realizó de manera espectrofotométrica, de acuerdo a lo reportado por Bryant y col. (1979). Las concentraciones (mg mL^{-1}) de ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina se determinaron con las siguientes fórmulas:

$$\text{Ficocianina (PC)} = [(A_{620\text{nm}} - 0.72 * A_{650\text{nm}}) / 6.29] \quad \text{Ec (4)}$$

$$\text{Aloficocianina (APC)} = [(A_{650\text{nm}} - 0.19 * A_{620\text{nm}}) / 5.79] \quad \text{Ec (5)}$$

$$\beta\text{-Ficoeritrina (BPE)} = [(A_{565\text{nm}} - 2.41\text{PC} - \text{APC}) / 12.70] \quad \text{Ec (6)}$$

Se determinó también la pureza de la BPE obtenida en cada muestreo, mediante la relación entre las absorbancias a 545 y 280 nm (Bermejo y col., 2011).

$$\text{Pureza de BPE} = \text{Abs}_{545\text{nm}} / \text{Abs}_{280\text{nm}} \quad \text{Ec (7)}$$

Se ha reportado que cuando esta relación es superior a 4, la BPE como producto comercial es clasificada como altamente purificado ($\geq 95\%$ de pureza) (Prozime, 2003; Benavides y Rito-Palomares, 2004).

3 Obtención de biomasa microalgal

La obtención de la biomasa de *P. cruentum* se realizó a partir del cultivo de esta microalga, como se describió anteriormente, partiendo de un volumen de cultivo de 3L. Con base en el análisis de los resultados conjuntos de las curvas de crecimiento, viabilidad celular y concentración de BPE, se determinó el día para la recuperación de la biomasa.

a Recuperación de la biomasa microalgal

La recuperación de la biomasa se realizó por floculación utilizando quitosano como floculante orgánico. Para establecer la concentración de quitosano a utilizar, se evaluaron las concentraciones de 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 mg L⁻¹, y se calculó la eficiencia de floculación para cada una de ellas, mediante la siguiente fórmula

Ec (8)

Para el ensayo se tomaron por triplicado 50 mL de cultivo a una DO_{580nm} inicial de 0.30, y se les añadió la concentración correspondiente a probar de quitosano, la floculación se llevó a cabo en agitación constante por 1 min, seguido de un tiempo de reposo de 5 min, tras los cuales se tomó la lectura de DO_{580nm} final. Con estos datos se calculó la eficiencia de floculación para cada concentración de floculante y mediante el análisis estadístico se estableció la mejor concentración de quitosano para llevar a cabo la floculación y recuperación de la biomasa de *P. cruentum*.

b Caracterización bioquímica

A la biomasa obtenida se le realizó un análisis proximal empleando la metodología estándar de la AOAC (1995). El método de micro- Kjeldahl fue utilizado para determinar la proteína cruda; la determinación de nitrógeno fue realizada en el sistema Kjeltex (modelo 1009, Foss Tecator). Para la determinación de lípidos, se realizó la extracción con éter de petróleo en el sistema Soxhlet (modelo 1043, Foss Tecator). La fibra se determinó secando y calcinando la muestra luego de su extracción con 0.5 mol L⁻¹ de H₂SO₄ y 0.5 mol L⁻¹ de NaOH. El contenido de cenizas se determinó por calcinación de la muestra

en mufla a 600 °C por 5 horas. Los análisis se realizaron por triplicado. La cantidad de carbohidratos se obtuvo de manera indirecta, restando los porcentajes de proteína, lípidos, fibra cruda y cenizas al 100%.

4 Extracción de BPE

a Ruptura celular

Para establecer el método de ruptura celular, se partió de la biomasa húmeda de *P. Cruentum*. Se utilizaron 30 mL de biomasa a una relación del 20% (p/v) en agua y se evaluaron dos métodos de ruptura, calentamiento y sonicación, tal como se muestra en la Figura 12. En el caso del método de ruptura celular por calentamiento, la biomasa al 20% (p/v) se calentó por 20 min, probando las temperaturas de 50 y 60 °C, y variando el método de calentamiento ya sea en agitación directa en placa o en baño María tomando como referencia la metodología de Ferrer y col. (2006). Por otra parte, para evaluar el método de ruptura celular por sonicación, se probaron dos técnicas, una utilizando un sonicador de baño (Branson 1800-MTH de 115 Volts, con frecuencia de 40 kHz) y la otra técnica consistió en utilizar un sonicador de pistilo (Microsonix XI a 550 watts con frecuencia de 40 kHz); para ello, se partió de la metodología descrita por Hernández-Mireless y Rito-Palomares (2006), y Ruiz-Ortega (2012).

Luego de aplicar el tratamiento de ruptura celular correspondiente, la biomasa se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min a 4°C, posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se valoró en el espectrofotómetro para calcular la concentración y pureza de BPE en el extracto, tomando en cuenta las ecuaciones 6 y 7 descritas anteriormente. Ambos parámetros, fueron empleados para calcular el

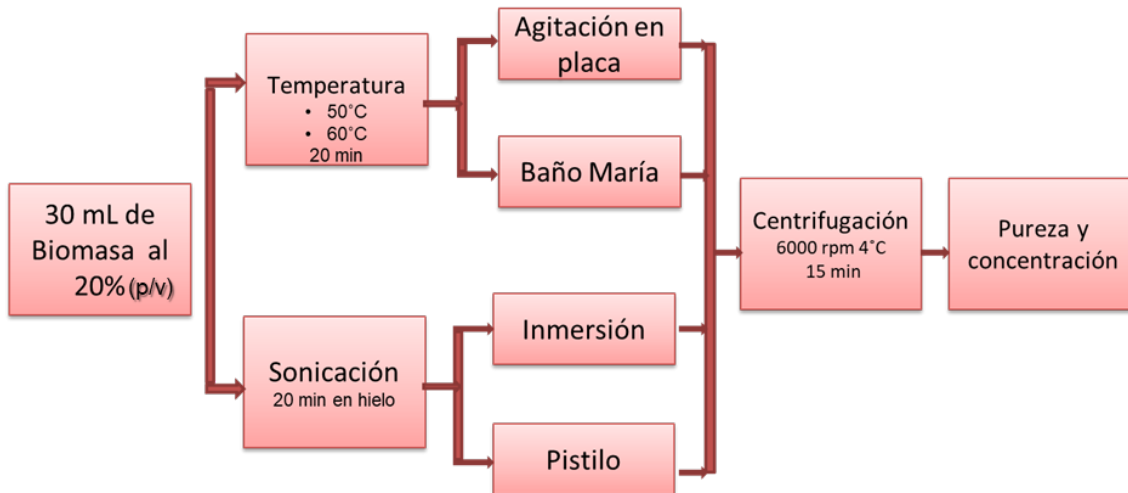


Figura 12. Diagrama de proceso para la evaluación de diferentes métodos de ruptura celular.

Índice de efectividad (IE), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$IE = \text{Concentración de la proteína (0.5)} + \text{Pureza de la proteína (0.5)} \quad \text{Ec (9)}$$

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y se analizaron estadísticamente.

b Temperatura de extracción

En esta etapa se buscó encontrar una mejor temperatura para la extracción de BPE, como se describe en la Figura 13, partiendo de las temperaturas propuestas por Juin y col. (2014). Se inició con una solución de biomasa de *P. cruentum* al 20% (p/v), se calentó durante 20 min variando 4 temperaturas (40, 50, 60 y 70°C); luego de esto, se centrifugó a 6000 rpm a 4°C por 15 min y se determinó la concentración y pureza de BPE con las ecuaciones 6 y 7 descritas con anterioridad. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y se analizaron estadísticamente.

c Concentración de biomasa y tiempo de calentamiento

Para complementar el proceso de extracción, se evaluó el efecto de la concentración de biomasa y el tiempo de calentamiento sobre la extracción de BPE. Se probaron 4 concentraciones de biomasa de *P. Cruentum* (5, 10, 15 y 20%, p/v) y 5 tiempos de calentamiento (10, 20, 30, 40 y 50 min). Luego de cada tratamiento se procedió a centrifugar la muestra a 6000 rpm, durante 15 min a 4°C y se evaluó el sobrenadante con las ecuaciones 6, 7 y 9. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y se analizaron estadísticamente. Ver Figura 14.

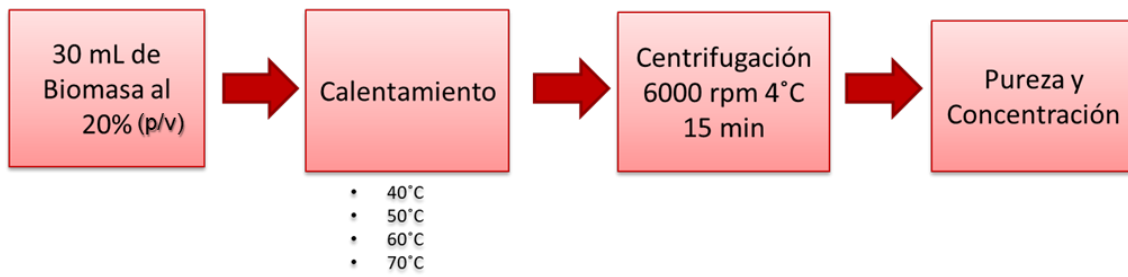


Figura 13. Diagrama de proceso para determinar la temperatura de extracción.

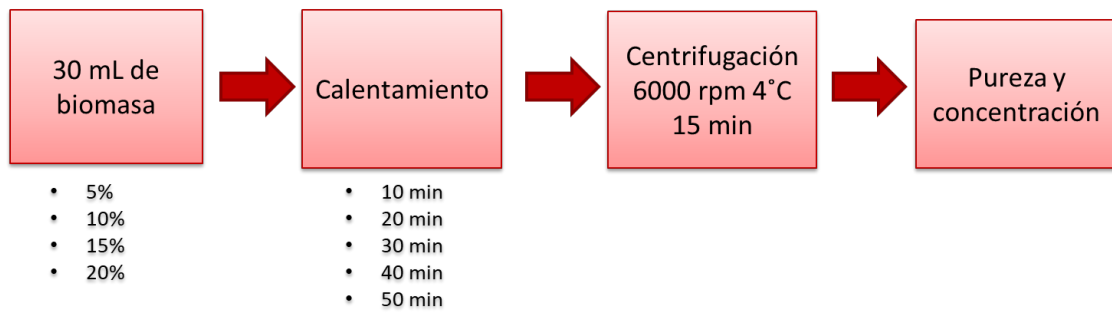


Figura 14. Estrategia para la determinación del efecto de la concentración de biomasa de *P. cruentum* y del tiempo de calentamiento, sobre la pureza y concentración de BPE.

5 Caracterización por electroforesis (SDS-PAGE) del extracto de BPE

Una vez obtenido el método completo para la extracción de BPE a partir de biomasa *P. cruentum*, éste fue utilizado para la obtención de un extracto proteínico, el cual se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE siguiendo la metodología por Laemmli (1970). La electroforesis vertical se realizó en un equipo Miniprotean III (Bio-Rad), usando un sistema de amortiguador discontinuo el cual consiste en un gel de poliacrilamida al 12.5% (p/v) de 1.0 mm de grosor que contiene SDS al 0.1% (p/v), con un gel concentrador de poliacrilamida al 4%. Se cargaron 21 µg del extracto proteínico nativo, así como la misma cantidad pero del extracto desnaturalizado por calentamiento a 95°C por 3 min, y un extracto proteínico preparado bajo condiciones reductoras en presencia de β-mercaptoetanol (5%). El gel se corrió a temperatura ambiente y se visualizó mediante tinción con azul de Coomassie R-250 al 0.1% (p/v) en metanol al 40% (v/v), y ácido acético al 7% (v/v), por 30 min, posteriormente el gel se destiñó en ácido acético al 10%, diluido en metanol al 50%.

6 Determinación de la capacidad antioxidante (CAOX)

a Método DPPH

En este ensayo se evaluó la capacidad del extracto proteínico rico en BPE para neutralizar un radical. El compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) es un radical estable que presenta coloración violeta y que absorbe radiación a 517 nm, de forma tal que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos.

Para el análisis, se determinó la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez añadida la muestra a evaluar; así, una disminución de la concentración de DPPH, debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante, promueve el cambio del color violeta a amarillo. El ensayo se realizó

según la metodología reportada por Lim y col. (2007). El radical DPPH se preparó en metanol a una concentración 150 μL . Para iniciar la reacción se mezclaron 20 μL de muestra con 180 μL de radical DPPH, la cual se homogenizó e incubó durante 30 min a 37°C, en oscuridad y bajo agitación constante (50 rpm). Finalmente, se determinó la absorbancia a 517 nm, todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Para la cuantificación de la capacidad antioxidante, se construyó una curva estándar de Trolox (0, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de BPE ($\mu\text{mol ET gBPE}^{-1}$).

b Método ABTS

La capacidad de captación de radicales libres del extracto proteínico rico en BPE, se determinó mediante el método de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etibenzotiazolina-6-sulfónico), el cual se basa en la generación de un cromóforo del radical ABTS (color azul-verde), y la capacidad antioxidante para decolorar este radical. El ensayo se realizó según la metodología reportada por Liu y col. (2009); se generó el radical ABTS mediante la reacción en 5 mL de una disolución de ABTS (7 mM en agua) y 1 mL de persulfato de potasio (2.45 mM), la mezcla se incubó durante 16 horas en oscuridad y temperatura ambiente (25 °C); posteriormente, se hicieron alícuotas de 1 mL y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Para el ensayo, una de las alícuotas se diluyó con amortiguador de fosfatos (Na_2HPO_4 10 Mm, KH_2PO_4 2 Mm, NaCl 137 mM y KCl 2.7 mM, (pH 7.4) hasta alcanzar una absorbancia entre 1.0 y 1.2 a 734 nm (ABTS diluido). La reacción se llevó a cabo utilizando 7.5 μL de muestra, o 7.5 μL de solvente como control, los cuales se mezclaron con 292.5 μL del radical ABTS diluido, la mezcla se incubó en oscuridad durante 10 min a 37°C y posteriormente se midió absorbancia a 734 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Para la cuantificación de la capacidad antioxidante se construyó una curva estándar de Trolox (0, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y los resultados se expresan como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de BPE ($\mu\text{mol ET gBPE}^{-1}$).

c Método FRAP

A través del método FRAP (poder antioxidante reductor de hierro), se determina el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . La reacción mide la reducción de la 2,4,6-tris-(2-piridi)-s-triazina (TPTZ) que se manifiesta como el cambio de color amarillo opaco a azul rey, detectando compuestos con potenciales redox $<0.7 \text{ V}$. El reactivo FRAP se preparó mezclando 2.5 mL de TPTZ (10 mM), 2.5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) y 25 mL de amortiguador de acetato de sodio (0.3 mM, pH 3.6); la mezcla se incubó por 30 min a 37 °C. Para la evaluación de la capacidad antioxidante, se mezclaron 1800 μL de reactivo FRAP recién preparado, 180 μL de agua desionizada y 10 μL de muestra (1 mg mL^{-1}); la mezcla se incubó por 30 min a 25°C y se midió la absorbancia a 595 nm (Benzie-Iris y Strain, 1996). El ensayo se realizó por triplicado.

Para la cuantificación de la CAOX se preparó una curva estándar de Trolox (400, 300, 200, 100, 50 y 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y los resultados fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox por gramo BPE en base seca ($\mu\text{mol ET gBPE}^{-1}$).

7 Ensayo *in vitro* de la capacidad antihipertensiva

La capacidad antihipertensiva del extracto proteínico rico en BPE, se evaluó de acuerdo a su capacidad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA). Los análisis *in vitro* para evaluar esta actividad se realizaron según lo descrito por Miguel-Castro y col. (2006) con algunas modificaciones de Germán-

Báez y col. (2014). La proteína previamente cuantificada se añadió a 100 μL de amortiguador de boratos 0.1 M adicionando 5 mM del sustrato hippuryl-histidyl-leucine (HHL), 0.3 M de NaCl, pH 8.3; se adicionaron 2 mU de ECA (EC 3.4.15.1, SIGMA) y la reacción se llevó a cabo a 37°C por 30 min, tras lo cual se detuvo adicionando 150 μL de HCl 1M. El ácido hipúrico formado, se extrajo con acetato de etilo (1000 μL), se centrifugó a 1500 x g por 10 min; se recuperaron 750 μL de la fase orgánica y se evaporaron por calentamiento a 95°C por 10 min. El residuo se disolvió en 600 μL de agua desionizada estéril y se midió la absorbancia a 228 nm. Las pruebas se realizaron por triplicado. La actividad inhibitoria se reportó como la concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la ECA (IC_{50}). El porcentaje de inhibición para cada concentración se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control} - \text{Abs blanco}} \times 100 \quad \text{Ec (10)}$$

El valor de IC_{50} se determinó mediante análisis de regresión no lineal del % de inhibición de ECA contra el log de la concentración de proteína (en $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), usando la ecuación de Hill y el programa GraphPad Prism 5.

8 Análisis estadístico

Para todos los análisis estadísticos, se utilizó un diseño completamente al azar de uno o dos factores (según correspondió). Las variables de respuesta variaron en cada caso, de acuerdo al experimento analizado. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se calcularon los parámetros de estadística descriptiva para cada uno de ellos, se llevó a cabo el análisis de varianza empleando el paquete estadístico Statgraphics-Plus 6.0 y la comparación de medias se realizó

mediante la prueba de múltiples rangos de Fisher con un nivel de significancia del 95% (LSD, $p \leq 0.05$).

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A CINÉTICAS DEL CULTIVO PARA *P. cruentum*

1 Establecimiento de la curva de crecimiento

La curva de crecimiento de *P. cruentum* se estableció mediante conteos celulares con cámara de Neubauer y microscopio óptico, según la metodología descrita. En la Figura 15 se muestra el comportamiento cinético del cultivo de *P. cruentum*, observándose un comportamiento sigmoideal típico. El cultivo se caracterizó por presentar una fase de latencia muy corta (1 día), que podría deberse a que se estableció mediante la técnica de transferencias sucesivas y, al momento de iniciarlo, este ya contaba con un número de células en constante reproducción y plenamente adaptadas tanto a la composición del medio como a las condiciones del cultivo. También se mostró una fase exponencial muy larga (16 días) que alcanzó el punto de inflexión al décimo sexto día con una densidad celular máxima de 1.35×10^6 cel mL⁻¹, en el Cuadro 5 se muestra una comparación de cultivos de *P. cruentum* con condiciones de crecimiento que varían respecto al volumen del medio, el fotoperiodo y el medio de crecimiento empleado. Por un lado se puede observar que González-Muñoz (2006) obtuvo valores menores de densidad celular (9.52×10^5 cel mL⁻¹) lo que podría estar relacionado con una fase exponencial mucho menor a las comparadas y a la presentada en este trabajo. Por otro lado, Saracco-Alvarez (2007) que además de emplear un volumen de cultivo mayor (10 L), utilizó el medio f Guillard; el cual contiene una cantidad mayor de nitrógeno que el medio f/2, lo que podría influir en la obtención de una densidad celular mayor (5.1×10^6 cel mL⁻¹), ya que el nitrógeno es fundamental en los procesos básicos de replicación del ADN, expresión génica, y síntesis de proteínas, lo que influye directamente en los procesos de crecimiento y división celular. Así mismo, Razhagui y col. (2014) emplearon agua de mar estéril y añadieron 5 veces las concentraciones del medio f/2, es decir, su medio se encontraba fortificado principalmente con

nitrógeno, demostrando que con un menor volumen (150 mL) y una cantidad menor de horas luz, es posible obtener una densidad celular máxima mayor (29.9×10^8 cel mL⁻¹). De la misma manera, la diferencia de densidad celular máxima obtenida en este trabajo respecto a lo obtenido por Rivera-Talamantes (2014), quien reportó una densidad celular máxima de 2.8×10^6 cel mL⁻¹ el décimo día de cultivo de *P. cruentum*, podría deberse a que el medio de cultivo f/2 fue preparado con agua de mar previamente esterilizada, misma que ya contiene algunos nutrientes, y a que el volumen de cultivo fue mayor al utilizado en el presente trabajo (3 L).

En relación a la fase exponencial aquí mostrada, se observa que es similar a lo reportado previamente por Paes y col. (2016) en un cultivo de *Chlorella* sp, quienes observaron una fase exponencial de 13 días y una densidad máxima de 6.96×10^7 cell mL⁻¹. En cambio, se muestra que You y Bannet (2014) obtuvieron una fase lag más larga (3d), lo que podría deberse a que el medio de cultivo utilizado fue agua de mar artificial y el crecimiento se llevó a cabo en un Reactor Bioflow III, por lo que al haber transferido el inóculo, hubo mayor dificultad para adaptarse y reproducirse; pero al iniciar la fase exponencial, la densidad celular fue mayor (4×10^9 cel mL⁻¹), estos autores afirman que la intensidad y la distribución de luz proporcionada por el biorreactor es determinante para el crecimiento de *P. cruentum*.

A partir de que el cultivo de *P. cruentum* entró en la fase estacionaria (día 17), se dejó unos días más hasta observar la aparición de, la fase de muerte, la cual se apreció a partir del siguiente día (18), lo cual significó que la fase estacionaria fue prácticamente nula. Este comportamiento, es típico en los cultivos celulares, donde al llegar a los días finales de cultivo, la densidad celular disminuye drásticamente, existiendo una mayor competencia de las células viables aún presentes, por los nutrientes restantes del medio, lo que genera una muerte celular estrepitosa (Steward y col., 1999).

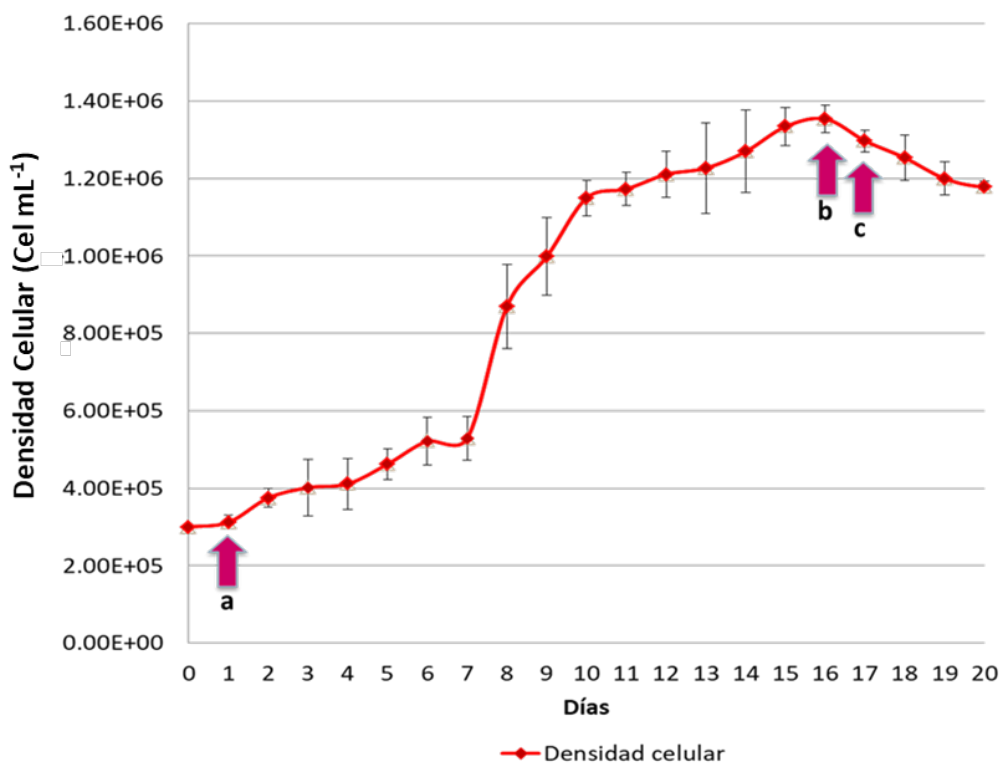


Figura 15. Curva de crecimiento del cultivo de *Porphyridium cruentum*. Cada punto representa el promedio de tres réplicas. Las barras de error indican la desviación estándar. Las flechas indican: a, el fin de la fase de latencia; b, el fin de la fase de crecimiento exponencial; c, el inicio de la fase de muerte.

Cuadro 5. Comparación de diferentes condiciones de cultivo de *P. cruentum*

Espece	Fase lag	Fase exponencial	Densidad celular máxima (cel mL ⁻¹)	Volumen cultivo	Fotoperiodo (horas luz: oscuridad)	Medio de cultivo	Referencia
<i>P. cruentum</i>	1d	6d	9.52 x 10 ⁵	2L	24:0	f/2	González-Muñoz (2006)
	2d	16d	5.1 x 10 ⁶	10 L	24:0	f Guillard	Saracco-Alvarez (2007)
	2d	14d	29.9 x 10 ⁸	150 mL	18:6	f/2	Razhagui y col. (2014)
	1d	10d	2.8 x 10 ⁶	150 mL	24:0	f Guillard	Rivera-Talamantes (2014)
	3d	16d	4 x 10 ⁹	500 mL	24:0	Agua de mar artificial	You y Bannet (2014)
	1d	16d	1.35 x 10 ⁶	3L	24:0	f/2	Ortiz-Bernal (2020)

d= días

a Determinación de parámetros cinéticos

A partir de la cinética de crecimiento celular, se determinaron la tasa de crecimiento específico (μ) y el tiempo de duplicación (dt) para la microalga *P. cruentum*, cultivada bajo las condiciones de laboratorio descritas anteriormente. Estos parámetros calculados fueron de 0.68 d^{-1} y 10.25 días, para μ y dt , respectivamente, los cuales, fueron contrastantes con los reportados por You y Barnet (2004), quienes obtuvieron valores de $\mu = 0.38$ y $dt = 2.66$ días, para esta misma microalga pero cultivada en un biorreactor BIO III, por lo que las diferencias podrían ser atribuidas a las condiciones ambientales, el tipo de cultivo y por los polisacáridos que estas microalgas producen, dado que estos autores también observaron que la viscosidad del medio aumentó sustancialmente a medida que las células fueron excretando este tipo de compuestos al ambiente, impidiendo que el cultivo alcanzara condiciones óptimas. Por otro lado, Oh y col. (2009) reportaron valores de tasas de crecimiento específico de 1.0 y 0.744 d^{-1} , en cultivos de *P. cruentum* a 30°C en matraces de 500 mL bajo fotoperiodos 18:12 h y 12:12 luz:oscuridad, en dicho trabajo, se alcanzó la densidad celular máxima el día 15 de cultivo, concluyendo que la cantidad de luz y su intensidad afectan al cultivo de esta microalga. Por otro lado, Rivera-Talamantes (2014) reportó que bajo condiciones constantes de luz proveniente de lámparas de 40 W en matraces de 150 mL y a 20°C de temperatura, *P. cruentum* puede alcanzar valores de μ y dt de 0.833 y 3 días; destacando así, la importancia de tener un buen control especialmente en la temperatura y la cantidad de luz durante el desarrollo del cultivo de *P. cruentum*.

b Curva de concentración de ficobiliproteínas

El contenido de ficobiliproteínas presentes en el cultivo de *P. cruentum* fue evaluado respecto a los días de cultivo. Los resultados se muestran en la Figura 16a, se aprecia que el contenido de ficocianinas, aloficocianinas y BPE aumenta con respecto al tiempo del cultivo, obteniendo máximos de 0.283 mg L⁻¹ de BPE, 0.0373 mg L⁻¹ de ficocianinas y 0.013 mg L⁻¹ de aloficocianinas a los 15 días del cultivo por lo que es posible comprobar que el contenido de la proteína de interés de este trabajo de investigación, la BPE, es mayoritario respecto al resto de las ficobiliproteínas, tal como ha sido reportado previamente para esta microalga; siendo la cantidad de BPE 21.7 veces mayor que de ficocianinas y 7.49 veces mayor que de aloficocianina al día 15 de cultivo. En términos de porcentaje, en el presente estudio, se pudo observar que el 84.9% del total de las ficobiliproteínas del cultivo de *P. cruentum* correspondió a BPE, mientras que el 11.2% fue de ficocianinas y las aloficocianinas representaron solamente el 3.9%. Resultados similares han sido reportados para *Porphyridum purpureum*, donde la proporción de BPE alcanzó inclusive hasta el 94.6% del total de las ficobiliproteínas, razón por la que la microalga tiene una apariencia purpura-rojiza intensa (Kathiresan y col., 2007).

Por otra parte, al hacer el análisis conjunto de la densidad celular y la concentración de BPE, se pudo observar que el aumento de BPE durante los días de cultivo de esta microalga, mostró el mismo comportamiento sigmoideal de crecimiento celular (Figura 16b); lo que podría deberse a que la proteína se encuentra en los ficobilisomas en la cara externa de la membrana tilacoidal y por lo tanto la concentración de esta ficobiliproteína es dependiente del número de células que haya en el cultivo (Ong y col., 1984). Adicionalmente, fue posible observar un decaimiento de la BPE de una forma similar a como en la curva de crecimiento se aprecia la aparición de la fase de muerte celular.

Para poder establecer un protocolo para la obtención de biomasa de *P.*

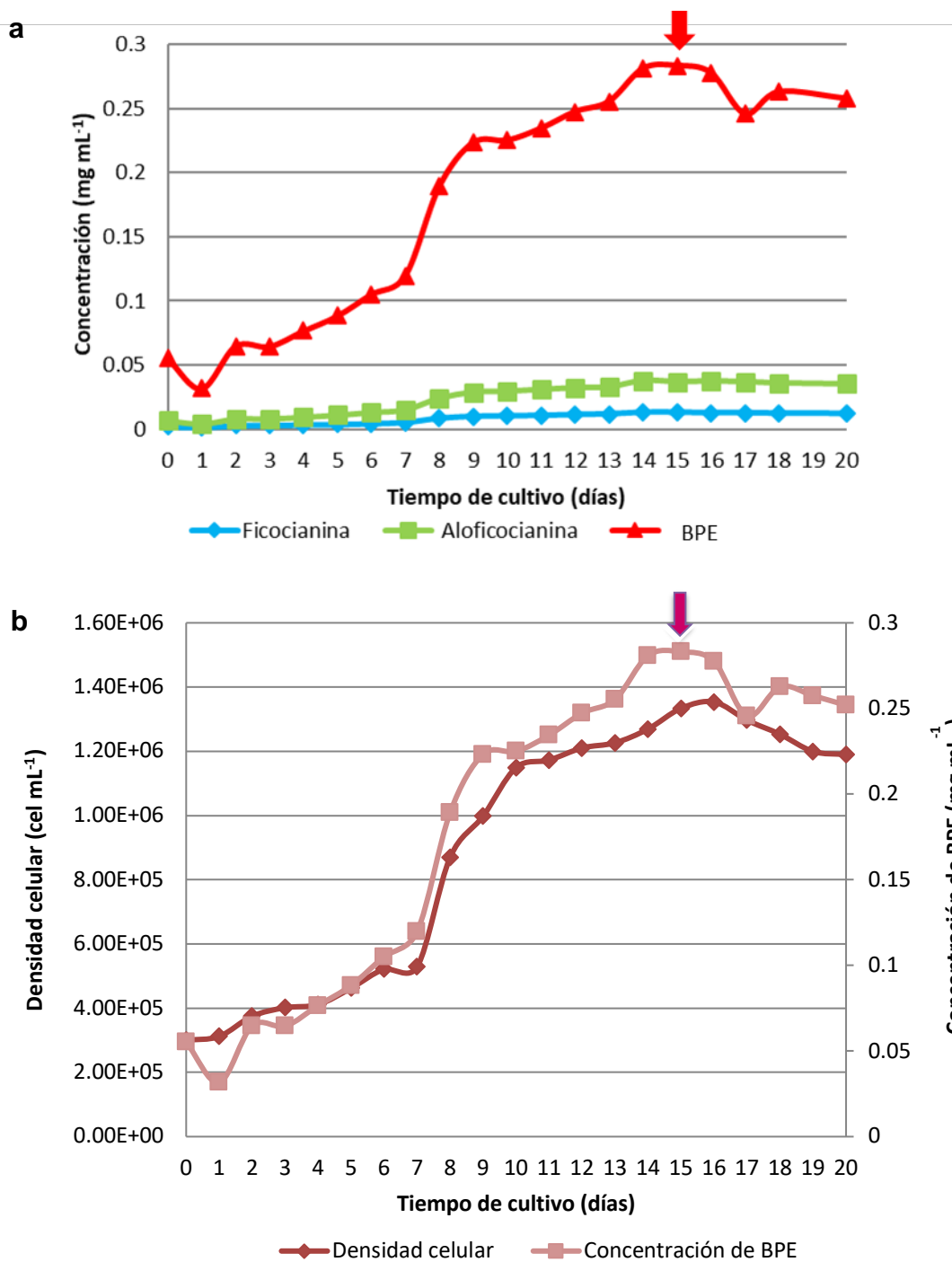


Figura 16. Concentración de ficobiliproteínas respecto a los días de cultivo de *P. cruentum*. a, Concentración de ficobiliproteínas durante los días de cultivo; b, contenido de B-ficoeritrina (BPE) respecto a la cinética de crecimiento celular.

Cruentum con alto contenido en BPE es necesario, en primera instancia, que el cultivo se encuentre en condiciones óptimas para la extracción, por lo que, considerando el día en el que se obtuvo la concentración máxima de BPE (0.2830 mg mL⁻¹) y una alta densidad celular (1.37 x 10⁶ cel mL⁻¹), se estableció el día 15 de cultivo, como el día de cosecha para la biomasa microalgal de *P. cruentum*.

B OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

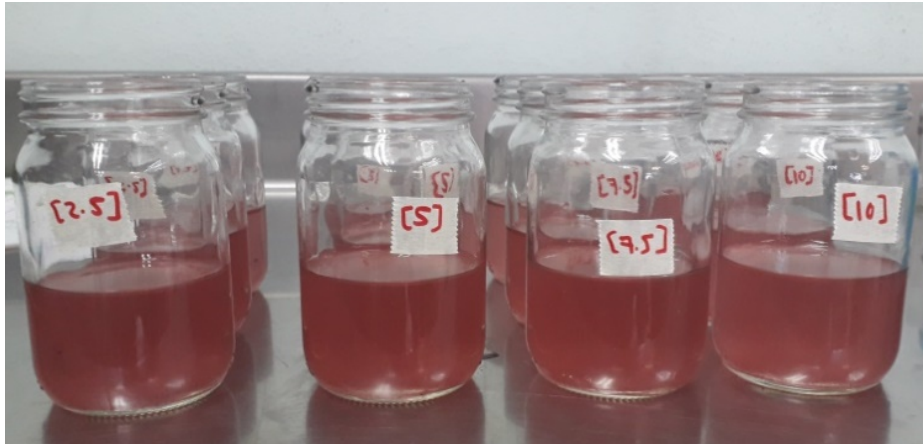
1 Recuperación de la biomasa microalgal

Una vez establecido el día de cosecha, se prosiguió a establecer una metodología para la recuperación de la biomasa, para ello, se inició con el establecimiento de un protocolo de floculación a partir de un compuesto orgánico, quitosano.

En la Figura 17a se muestran las suspensiones de biomasa microalgal, y la Figura 17b muestra el efecto de la adición de quitosano a las diferentes concentraciones evaluadas. Por otro lado, en la Figura 18 se muestran los porcentajes de eficiencia de floculación calculados para cada concentración evaluada, observando que para la concentración de 2.5 mg L⁻¹ se obtuvo un rendimiento de 75.88%, mientras que para el resto de las concentraciones (5, 7.5 y 10 mg L⁻¹), se alcanzó una eficiencia del 100% de floculación, es decir, que toda la biomasa microalgal suspendida en el medio, fue recuperada. Por lo tanto, se estableció la concentración de 5 mg L⁻¹ de quitosano a pH 8, para la floculación de la biomasa celular de *P. cruentum*. Para completar el proceso de obtención de la biomasa, después de la floculación, ésta se recuperó por decantación y posteriormente por centrifugación (4,500 rpm a 4°C por 15 min), con el fin de clarificar el medio líquido en donde se cultivó.

La concentración de floculante establecida aquí, es mucho menor a la utilizada

a



b

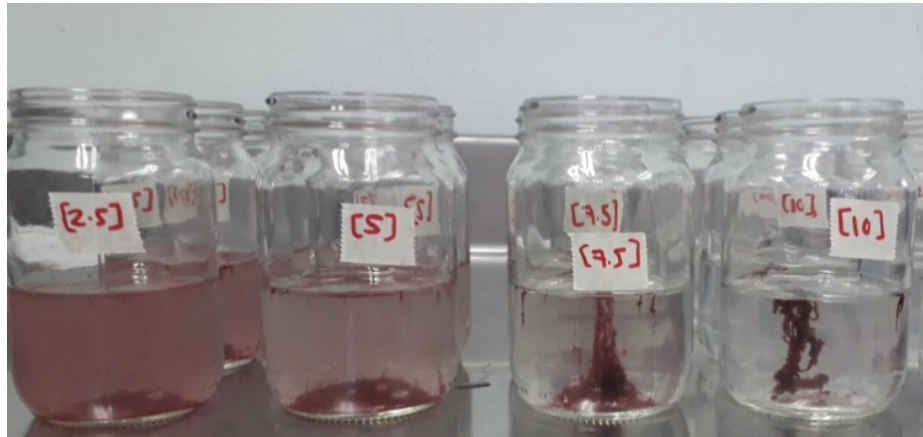


Figura 17. Floculación de la biomasa celular de *P. cruentum* a diferentes concentraciones de quitosano. a, medio de cultivo celular antes de la adición del floculante. b, efecto de la adición de quitosano en las diferentes concentraciones (expresadas en mg L^{-1}), al min de añadir el floculante.

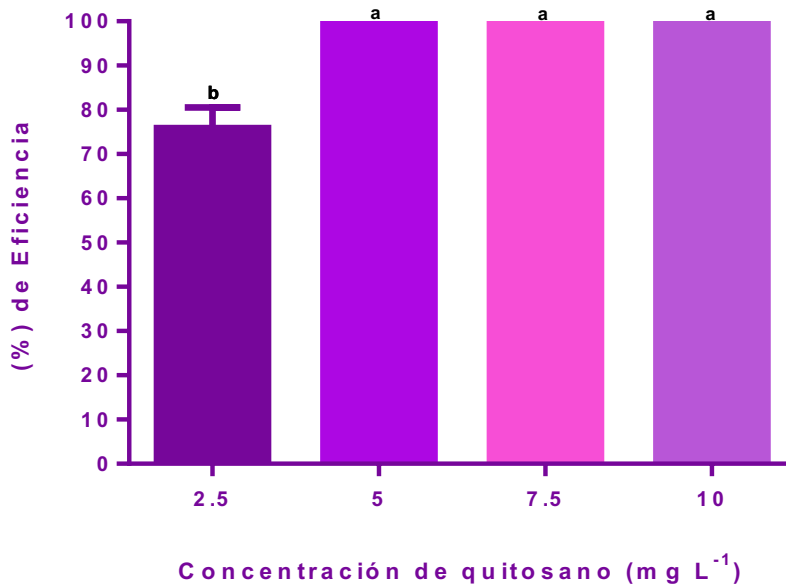


Figura 18. Efecto de la concentración de quitosano sobre la eficiencia de floculación de la biomasa de *P. cruentum*. Cada valor representa la media de tres réplicas independientes. Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher, LSD = 4.3969 , $P \leq 0.05$). La barras de error representa la desviación estándar.

por Romero y Ferrán (2001) quienes utilizaron 117 mg L^{-1} de quitosano para recuperar la biomasa de la microalga *Chlorella sp*, obteniendo un 90 a 100% de eficiencia floculación. Rashid y col. (2013) evaluaron la dosis efectiva de quitosano para flocular *Chlorella vulgaris*, logrando una eficiencia del 99% al añadir 120 mg L^{-1} . Por otro lado, Lubian y col. (1989) flocularon un cultivo de la microalga roja *Rhodomonas baltica* usando quitosano como floculante, y obtuvieron el 75% de eficiencia añadiendo 89 mg L^{-1} . Las diferencias entre las diferentes concentraciones utilizadas en el presente trabajo y los reportes previos, podrían deberse a que las dosis de quitosano varían según el tipo de microalga empleada, la densidad de la suspensión celular floculada, el medio de cultivo empleado ó las propias condiciones de cultivo. En el caso de *P. cruentum*, el medio celular posee un pH de 8 y, de acuerdo a Gualteri y col. (1988), el comportamiento del quitosano es afectado por el pH, en condiciones ácidas se encuentra como una cadena lineal debido a que los grupos $-\text{NH}_2$ tienen una carga positiva y se encuentra disperso por que éstas se repelen entre sí, provocando que el quitosano se encuentre disperso. A pH alcalino, las cargas positivas gradualmente desaparecen y el quitosano tiende a agruparse entre sí, atrapando la biomasa y precipitándola.

En este caso, el quitosano y las células de *P. cruentum* interaccionan entre sí mediante cargas electrostáticas. El quitosano se une a la carga negativa de la superficie microalgal por medio de su grupo positivamente cargado. Entonces, los puentes de hidrógeno se forman entre las células microalgales cuando la cadena adquiere suficiente longitud para unir más de una célula (Tuan-Harith y col., 2009). En este sentido, se considera que el pH de la suspensión celular de *P. cruentum* obtenido en el presente trabajo, permitió a la células adquirir una carga negativa máxima por lo que la eficiencia de floculación fué alta, aún y cuando la concentración de quitosano empleada fue mucho menor que la reportada en numerosos trabajos.

Una vez establecidas las condiciones para la recuperación de la biomasa microalgal, se procedió a calcular los rendimientos del cultivo, observando que a partir de un lote de cultivo crecido en un volumen de 3000 mL fue posible obtener 3.78 g de biomasa húmeda por litro de cultivo, lo que equivale a 0.4536 g de biomasa seca por litro cultivado. Resultados, que son similares a los obtenidos por Kathiresan y col. (2007) con *P. purpureum*, que alcanzaron un rendimiento de 3.4 a 9.12 g L⁻¹ de biomasa húmeda, esto a pesar de presentar diferencias en el medio de cultivo utilizado los volúmenes de cultivo y la especie microalgal. El rendimiento de biomasa microalgal obtenida en el presente trabajo, esta por arriba de lo reportado por Cervantes-Blanco y col. (2017) para la misma microalga, quienes obtuvieron 0.38 g L⁻¹ de biomasa seca en su cultivo.

2 Caracterización bioquímica

Los resultados de los análisis proximales de la biomasa de *P. cruentum* se presentan en el Cuadro 5. Como se observa así mismo, la biomasa microalgal obtenida esta compuesta de un 73.4% de carbohidratos; mientras que el contenido de proteína fue de 9.82%, este valor fue menor a lo reportado por Reboloso-Fuentes y col. (2000) quien reportó 34.4% utilizando un medio Hemerick modificado, el cual fue elaborado con agua de mar estéril, por lo que no se adicionaron las sales NaCl, KCl, CaCl₂ y MgSO₄; cabe destacar que este medio cuenta con una cantidad mayor de nitrógeno que el medio f/2, ya que además de contener una concentración mucho mayor de NaNO₃, contiene (NH₄)₆Mo₇O₂₄.24H₂O, haciendo más disponible este nutriente. Además, estos autores utilizaron un reactor tubular donde el medio de cultivo tenía un tiempo de residencia de 9.57 días lo cual permitía que el cultivo microalgal no tuviera limitaciones de nutrientes. Así mismo, Bermejo y col. (2002) utilizando un biorreactor tubular y el medio de Hemerick, reportó valores de 33% de proteína, lo que puede deberse a diversos factores como el volumen de cultivo, el día de cosecha, método de recuperación, o las condiciones de cultivo. Por otro lado,

Cuadro 6. Composición bioquímica de la biomasa de *P. cruentum*

Composición	Porcentaje (bs)
Proteínas	9.82 ± 0.42
Lípidos	1.2 ± 0.03
Fibra cruda	6.63 ± 0.087
Cenizas	8.94 ± 0.013
Carbohidratos	73.4 ± 0.05

Los valores corresponden al promedio de tres réplicas ± la desviación estándar.

bs = base seca

Ginzberg y col. (2000) reportaron una composición bioquímica de la biomasa de *P. cruentum* compuesta de 15% de proteínas, 65% de carbohidratos y 10% de lípidos.

Dupré y col. (1994) reportaron que la BPE puede servir como un reservorio de nitrógeno para la microalga, por lo que, bajo condiciones deficientes de nitrógeno, las ficobiliproteínas pueden ser digeridas para suplementar aminoácidos para otras funciones metabólicas importantes, contribuyendo con esto a disminuir el contenido de proteínas totales. Lo que deja de manifiesto la necesidad de optimizar las condiciones de cultivo, proporcionando condiciones de nitrógeno Disponible suficiente para tener un rendimiento alto de BPE en la biomasa de *Porphyridium*.

En relación al elevado contenido de carbohidratos encontrado en este trabajo, esto podría estar causado por que el contenido celular de *Porphyridium sp.* puede variar en respuesta a la intensidad de luz y al metabolismo, por ejemplo fotosintético o respiratorio, y por ello también varía la respuesta a los ciclos de luz: oscuridad. En *P. cruentum* una intensidad de luz alta estimula la formación de almidón y de exopolisacáridos (Razhagui y col. (2013). Además, la biomasa fue obtenida; como se describió anteriormente, por medio de floculación con quitosano, un polisacárido que podría haber aumentado este valor.

La concentración de nitrógeno del medio y numerosos factores tales como la intensidad luminosa, temperatura, pH, y la concentración de CO₂, así como el tipo de reactor, tipo de cultivo (continúo, semicontinuo o estacionario), también afectan la síntesis de proteínas, ácidos grasos y carbohidratos. En este sentido, los resultados de Del Pilar Sánchez-Saavedra y col. (2018) mostraron, por ejemplo, que una intensidad de luz alta puede mejorar significativamente el contenido de carbohidratos y de la proteína BPE en *Porphyridium cruentum*, por lo que, los parámetros nutricionales y ambientales del presente trabajo podrían posteriormente ser optimizados, ajustando algunos de los parámetros del cultivo a efecto de mejorar aun más los rendimientos.

C OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO PROTEÍNICÓ RICO EN BPE

1 Ruptura celular

Para la obtención del extracto proteico se planteó un procedimiento en donde se probaron diferentes métodos de ruptura celular partiendo de la biomasa húmeda. Con el fin de evaluar la eficiencia de cada tratamiento, se estableció el índice de efectividad (IE), el cual relaciona la concentración de la proteína BPE en el extracto y su pureza (Ecuación 9). Como se muestra en la Figura 19 el método de calentamiento directo en placa presentó un IE de 0.6624, y el calentamiento en baño María de 0.6775; utilizando comparación de medias de Fisher, $P \leq 0.05$, estos tratamientos no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre ellos, sin embargo sus índices de efectividad fueron estadísticamente mayores a los presentados por los métodos de sonicación en cualquiera de las modalidades evaluadas, de pistilo e inmersión, los cuales presentaron valores de 0.4535 y 0.2624, respectivamente.

Debido a que en el presente trabajo se busca encontrar el mejor método de extracción, y dado que los métodos de calentamiento mostraron ser más efectivos, aun cuando no presentaron diferencia significativa entre ellos, se eligió el método de calentamiento directo en placa, debido a que este método permite tener un mayor y mejor control de la temperatura a utilizar, lo que lo hace más reproducible y escalable; lo anterior se puede apreciar claramente, ya que este método presentó una de las menores desviaciones estándar, de tan solo 0.002. Como ya se mencionó, en el presente estudio, mediante el método de calentamiento en placa con agitación, se logró un índice de efectividad 0.6624 en la extracción de BPE, lo que equivale a una concentración de $0.2889 \text{ mg mL}^{-1}$ de BPE, a una pureza de 1.0236; este tratamiento, resultó ser más

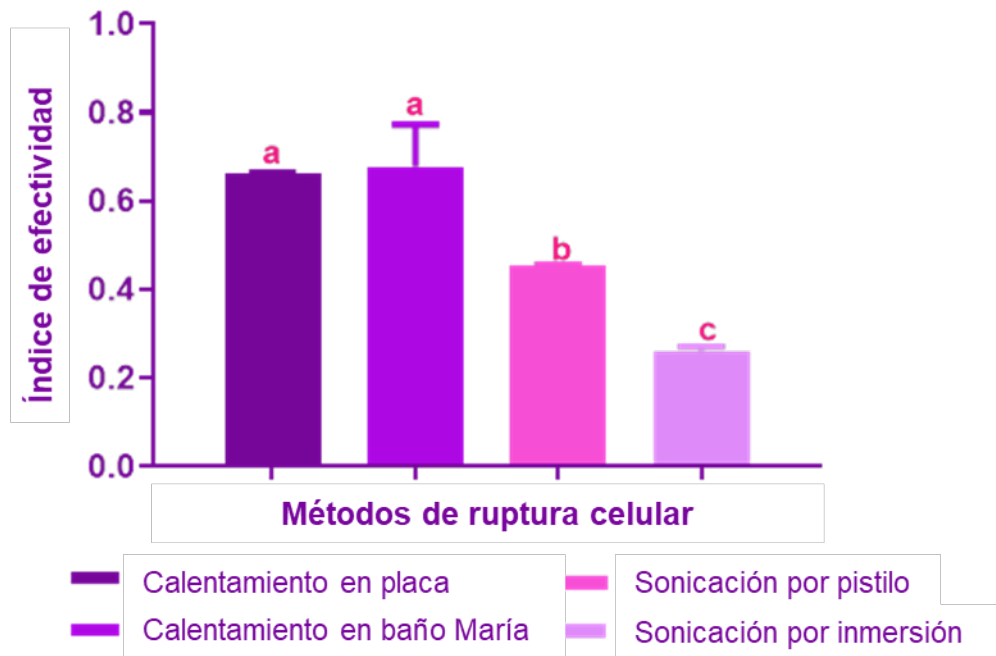


Figura 19. Efecto del método de ruptura celular sobre Índice de efectividad en la extracción de BPE. Cada valor representa la media de tres réplicas independientes. Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher, LSD = 0.0906, $P \leq 0.05$). La barra de error representa la desviación estándar.

efectivo que el método de ruptura celular propuesto por Hernández-Mireless y col. (2006), en el que obtuvieron una concentración de BPE de 0.22 mg mL^{-1} y una pureza de 0.7 utilizando biomasa de *P. cruentum* y utilizando un procedimiento de ruptura celular por sonicación. La diferencia en la pureza puede deberse a que la concentración de las otras dos ficobiliproteínas (aloficocianinas y ficocianinas) es menor, lo que podría estar asociado a que la BPE se encuentra más expuesta en la membrana tilacoidal y es más fácilmente extraíble (Arteni y col., 2007), pudiéndose liberar con mayor eficiencia a través del método de ruptura propuesto en el presente proyecto.

Por todo lo anterior, se puede deducir que, el método de calentamiento directo en placa resulta ser más efectivo para romper la membrana celular y liberar los pigmentos intracelulares de la membrana tilacoidea, logrando con ello una mayor concentración del producto intracelular de interés.

2 Temperatura de extracción

Una vez establecido el calentamiento en placa como método de ruptura celular, se analizó el efecto de diferentes temperaturas, con el fin de mejorar la extracción de BPE, para cual se probaron las temperaturas de 40, 50, 60 y 70 °C. En la Figura 20 se muestra el efecto de cada temperatura de extracción sobre la concentración de BPE y la pureza de la misma, a través del cálculo del IE. Como se puede observar, no existe diferencia significativa entre los índices de efectividad de los tratamientos de 40, 60 y 70 °C, cuyos valores son de 0.5016, 0.4911 y 0.4624, respectivamente; sin embargo estos valores son estadísticamente menores al IE obtenido con el tratamiento a 50 °C, a partir del cual se obtuvo el mayor índice con un valor de 0.9380, lo que equivale a una concentración de 0.144 mg mL^{-1} de BPE y una pureza de 1.73. Estos resultados son comparables al estudio de Doke (2005), quién evaluó diferentes métodos de extracción de ficocianinas, y por medio de calentamiento en agua a 50 °C por una hora, obtuvo una pureza de 0.95 y una concentración de 16.5 mg mL^{-1} ,

demostrando que es posible obtener ficobiliproteínas a partir de métodos sencillos de extracción con una pureza grado alimentario. Por tal motivo, se seleccionó el tratamiento de 50°C de calentamiento directo en placa, para la extracción de BPE.

3 Efecto de la concentración de biomasa y tiempo de calentamiento sobre la extracción de BPE

Al analizar el efecto de la concentración de biomasa (5, 10, 15 y 20%, p/v) y el tiempo de calentamiento (10, 20, 30, 40 y 50 min), sobre el IE se pudo observar (Figura 21) que de los 20 tratamientos evaluados, el tratamiento con el mayor IE (0.7433) fue el que combina una concentración del 5% durante 30 minutos de calentamiento.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo, bajo las condiciones empleadas, se logró establecer que el calentamiento directo en placa a 50 °C, durante 30 minutos fue el mejor método evaluado para la extracción de BPE partiendo de una concentración de biomasa celular del 5%. Con este procedimiento de extracción fue posible obtener un extracto con una concentración de 0.05 mg mL⁻¹ de BPE con una pureza de 2.3. Estos resultados concuerdan con Juin y col. (2014) quienes obtuvieron un extracto proteínico rico en BPE y ficocianina a partir de un cultivo de *P. purpureum*, por calentamiento con microondas a 40°C, logrando una pureza de BPE de 2.2. En cambio, Basaca-Loya y col. (2009) obtuvieron un extracto de la microalga roja *R. marinus* con una pureza de 4.8; sin embargo, la metodología empleada por este grupo de investigadores incluyó etapas de purificación mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión por tamaño, seguida de una cromatografía de intercambio aniónico, lo cual lo convierte en una metodología muy laboriosa y con poco o nulo potencial de escalamiento. En este sentido, con la metodología basada en el calentamiento, como la establecida en el presente trabajo, se obtienen extractos proteínicos ricos en BPE que, si bien, poseen una menor

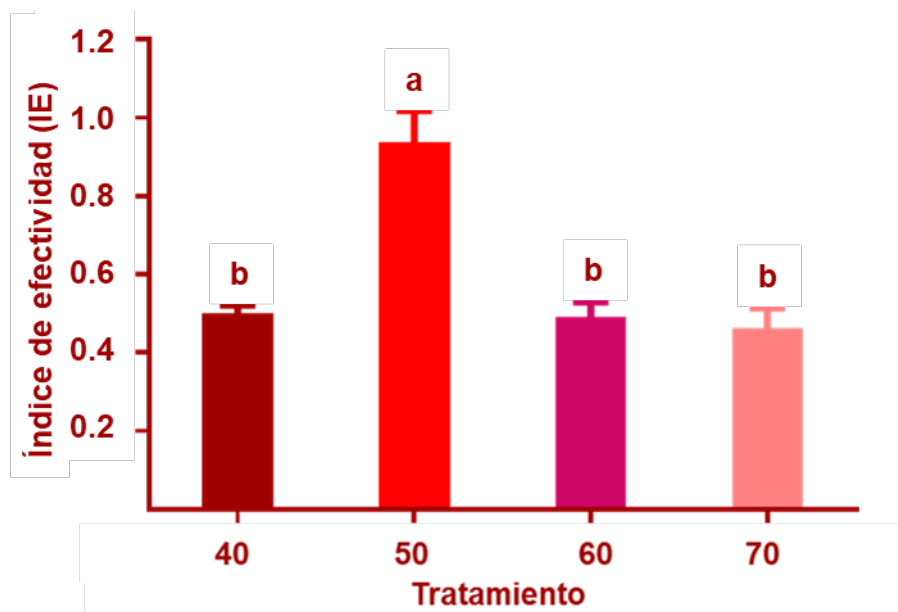


Figura 20. Efecto de la temperatura de extracción sobre el índice de efectividad para BPE. Se muestra el IE obtenido a través de la aplicación de diferentes temperaturas; cada valor representa la media de tres réplicas independientes. Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher, LSD = 0.077, $P \leq 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar.

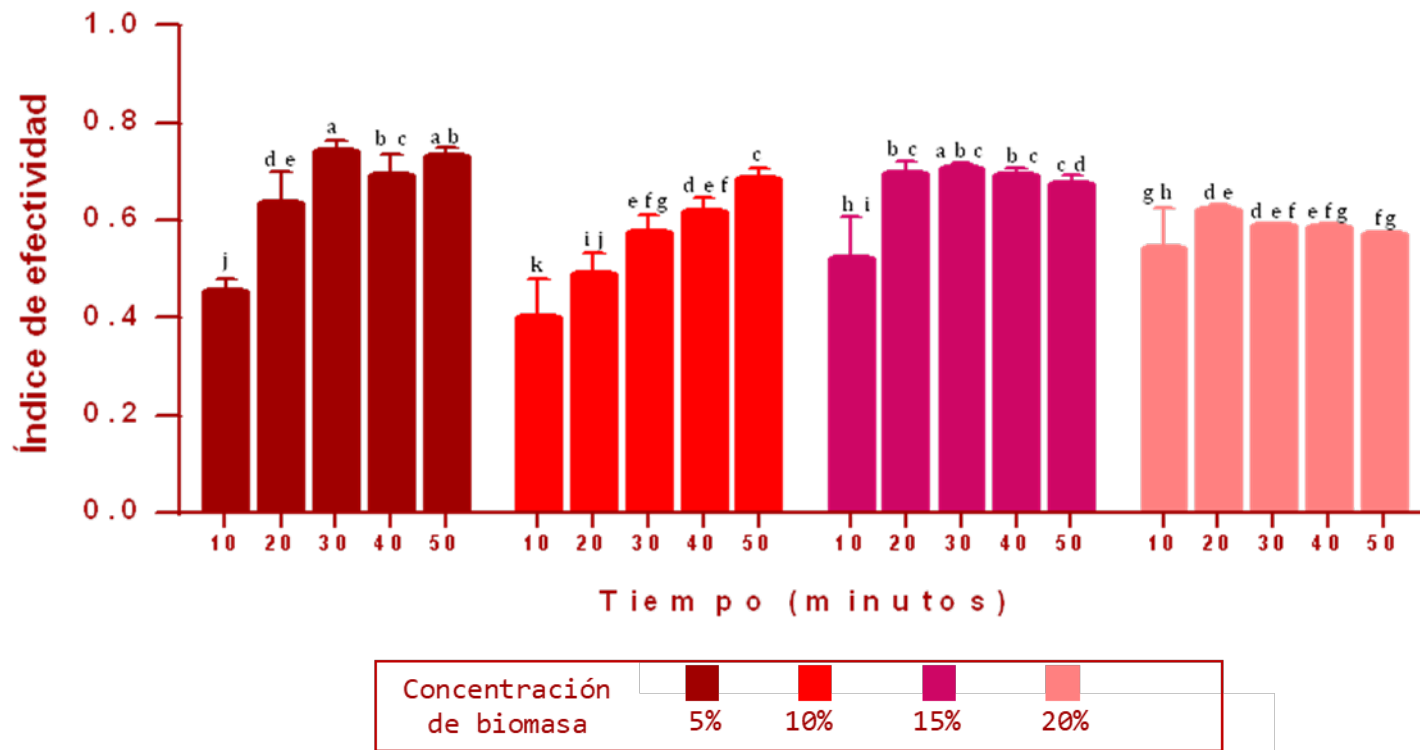


Figura 21. Efecto de la concentración de biomasa y tiempo de calentamiento en el índice de efectividad para la obtención de un extracto proteínico rico en BPE. Cada valor representa la media de tres réplicas independientes. Letras diferentes indican diferencia significativa (Fisher, LSD = 0.046, $P \leq 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar.

pureza, tienen como ventaja que son más rápidos y sin necesidad de altas presiones, enzimas, sales, solventes tóxicos, sonicación, sistemas de fases, o filtrados; consecuentemente, se disminuye significativamente el número de etapas durante el proceso de extracción y evita protocolos largos y de alto costo; lo cual se traduce en un alto potencial de escalamiento.

En relación al rendimiento de extracción de la BPE, los resultados muestran que a través de la metodología aquí descrita, es posible obtener hasta 46 mg de BPE a partir de 6 g de biomasa de *P. cruentum*. Este rendimiento es mayor a lo reportado por Cervantes-Blanco (2017), quien a partir de 11.5 g de biomasa de *P. cruentum* obtuvo 28.8 mg de BPE, que equivalen a un rendimiento 2.5 mg de BPE/g de biomasa. No obstante, también se han reportado rendimientos mayores a los obtenidos en el presente trabajo, por ejemplo, Tang y col. (2016) recuperaron, a partir de 5 g de biomasa de *P. cruentum*, 57 mg de BPE, lo que corresponde a 11.4 mg de BPE/g de biomasa; sin embargo, esta metodología de extracción hace uso de cromatografía de intercambio aniónico como último paso de purificación, haciéndola más laboriosa que la descrita aquí.

D CARACTERIZACIÓN ELECTROFORÉTICA DEL EXTRACTO PROTEÍNICO DE BPE

El extracto proteico rico en BPE obtenido a través del método descrito anteriormente, fue analizado por SDS-PAGE. Para ello, se utilizaron muestras del extracto en condiciones nativas, desnaturizantes y otra más bajo condiciones reductoras, los resultados se muestran en la Figura 23. Como se puede observar, en el extracto proteico bajo condiciones nativas se observa la presencia de una sola banda de alto peso molecular de aproximadamente 150 kDa (Figura 23 a y b, carril 2). En el gel sin teñir, (Figura 22a) se observa la banda de color rosa fluorescente, característico de la BPE, mientras que en el gel teñido (Figura 22b), se sigue observando únicamente esta misma banda, lo que indica la presencia mayoritaria de BPE en el extracto. Por otra parte,

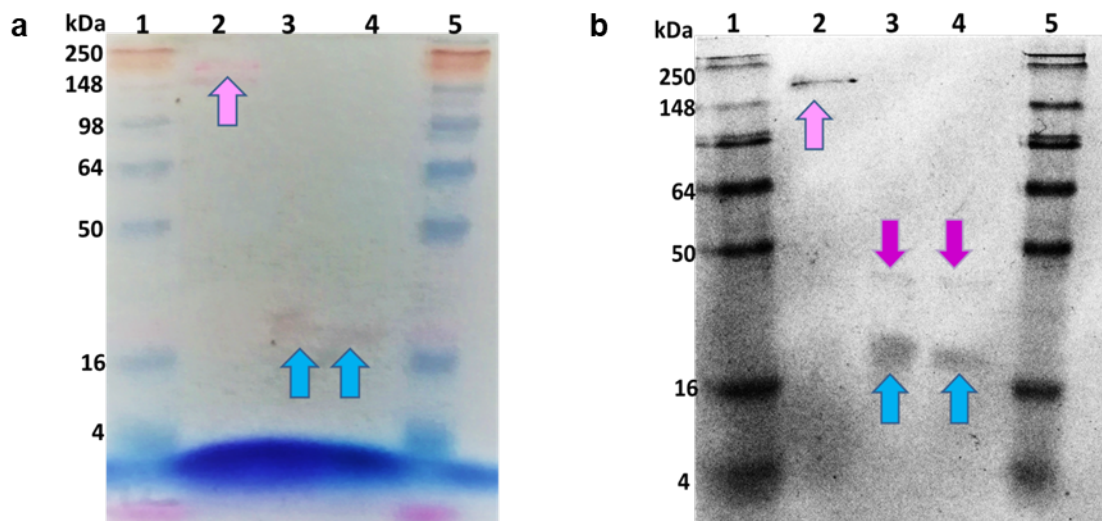


Figura 22. Análisis por SDS-PAGE del extracto proteínico rico en BPE. a, Gel sin teñir. b, Gel teñido con azul de Coomasié. Carriles: 1 y 5, Marcador de peso molecular (SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Standard); 2, Extracto proteínico rico en BPE bajo condiciones nativas; 3, Extracto proteínico rico en BPE bajo condiciones desnaturalizantes; 4, Extracto proteínico rico en BPE bajo condiciones reductoras; 5, En cada carril se cargaron 21 μg del extracto proteíco.

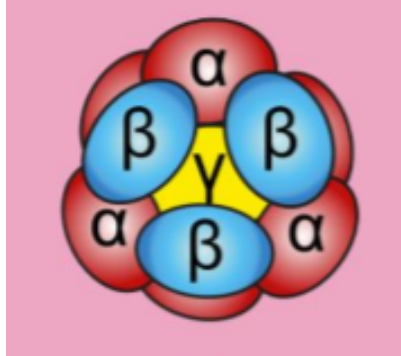


Figura 23. Esquema del complejo de β -ficoeritrina a pH fisiológico. BPE consiste predominantemente en un complejo altamente fluorescente $\alpha_6\beta_6\gamma$, donde la γ se encuentra en el centro del complejo. Tomado de Leney y col. (2018).

cuando el extracto fue desnaturalizado o corrido bajo condiciones reductoras (Figura 22 a y b, carriles 3 y 4), en el gel sin teñir ya no se observa la banda de alto peso molecular, pero sí la aparición de una banda ligeramente rosada de un menor peso molecular, de aproximadamente 20 kDa; mientras que, cuando el gel fue teñido con azul de coomasie, se reveló la presencia de una banda más de aproximadamente 30 kDa, en ambas condiciones (Figura 22b, carriles 3 y 4). Estos resultados muestran la separación electroforética del extracto total de proteínas, conteniendo de manera presuntiva sólo BPE (ya que no se observan otras bandas), la banda mostrada de aproximadamente 150 kDa bajo condiciones no reductoras, corresponde al tamaño de la BPE incluyendo sus dos subunidades α y β agrupadas con una γ , como polipéptido $(\alpha\beta)_3\gamma$ (Figura 24). Interesantemente, al observar el gel sin tinción (Figura 22a), se demuestra la capacidad que posee la BPE para ser utilizada como un marcador molecular y como un colorante, debido a que se observa a simple vista la banda del típico color rosa fluorescente, coincidiendo con lo reportado por Leney y col (2018) y por Kamble y col (2018), quienes encontraron que cuando la BPE se encuentra agrupada como un polipéptido, sus propiedades fluorescentes son más visibles y puede ser utilizada en ensayos inmunológicos.

Por otra parte, al apreciar el extracto bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, se logró la separación de las subunidades que conforman la proteína, observando la presencia de dos bandas, una correspondiente a las subunidades α y β , cuyo peso molecular de aproximadamente 20 kDa, y otra que corresponde a la subunidad γ de aproximadamente 30 kDa. Estos resultados coinciden con los estimados por Redlinger y Gantt (1981) y Bermejo y col. (2002; 2003) quienes reportaron bandas correspondientes al heteropolímero de las subunidades $(\alpha\beta)\gamma$, de 18.9 y 20.3 kDa para las subunidades α y β , agrupadas en una misma banda debido a que su tamaño es muy similar y no es posible separarlas con el método electroforético empleado. Para la subunidad γ reportaron valores aproximados a 27 kDa. Así mismo, Basaca-Loya y col. (2009), mostraron valores de las

subunidades de BPE, α y β de 27 y 26.8 kDa, respectivamente. Por lo que los resultados obtenidos en este estudio son comparables a los observados previamente por diversos autores.

E EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVA DEL EXTRACTO PROTEÍNICÓ RICO EN BPE

1 Capacidad antioxidante

Con la finalidad de evaluar la capacidad antioxidante con una mejor precisión, se tomaron en cuenta los diferentes mecanismos de actividad antioxidante y sus respectivas metodologías, ya que, la determinación de la CAOX a partir de un solo método no es suficiente, por lo anterior, se obtuvieron los valores de CAOX del extracto proteínico rico en BPE empleando tres métodos diferentes (Cuadro 7).

La CAOX del extracto obtenido en este estudio fue mayor al determinarse por el método de FRAP (3755.82 $\mu\text{mol ET/g BPE}$), lo que significa que por sus características químicas, el método FRAP es el más afín para su evaluación.

En relación a los métodos de DPPH y ABTS, los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron 1173.18 y 892.7 $\mu\text{mol ET/g BPE}$, respectivamente; siendo superiores a los reportados por Norzagaray-Valezuela y col. (2017) quienes determinaron la capacidad antioxidante de hidrolizados de proteínas microalgales, y encontraron valores para proteínas provenientes de *Dunaliella tertiolecta* de 437.01 $\mu\text{M ET g}^{-1}$ y 19.23 para ABTS y DPPH, en el caso de *Tetraselmis suecica* se encontraron valores de 696.99 y 21.29 respectivamente.

Por otro lado, Germán-Baez y col. (2017) evaluaron la CAOX de biomasa residual de *T. suecica* por medio de ensayos de ABTS y DPPH obteniendo

Cuadro 7. Capacidad antioxidante del extracto proteínico rico en BPE

Capacidad antioxidante ($\mu\text{mol ET/g BPE}$)		
DPPH	ABTS	FRAP
1173.18	892.70	3755.82

valores de, 67.93 y 9.54 $\mu\text{M ET g}^{-1}$, respectivamente, aportando así más evidencia en favor de que las microalgas poseen una gran cantidad de compuestos bioactivos que difieren químicamente de su composición y disponibilidad. Es importante destacar que las diferencias podrían deberse a no solo la diferencia entre las especies microalgales, o a las características del cultivo, sino también al tipo de solvente empleado en la extracción. Por ejemplo, Goiri y col. (2012) reportaron que al evaluar 32 especies de microalgas, el extracto que mostraba mejores resultados era el de etanol/agua, mostrando mejores resultados que los extractos de hexano y acetato de etilo; por lo que, en el caso del presente estudio, dado que la BPE es una proteína hidrosoluble, se empleó agua como solvente de extracción.

2 Actividad antihipertensiva *in vitro*

Se realizó el ensayo *in vitro* de inhibición de ECA y se calculó el valor de IC_{50} para el extracto proteínico rico en BPE. La Figura 24 ilustra la curva de dosis-respuesta para inhibición de ECA, la cual presenta un comportamiento sigmoidal, con un ajuste a una regresión no lineal mediante la ecuación de Hill, la concentración se muestra en escala logarítmica. Como se puede observar, este extracto alcanza un máximo de inhibición de 59.1%, a la máxima concentración evaluada, el ajuste de regresión no lineal nos permitió calcular el valor de IC_{50} , el cual fue de 10.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Debido a que el valor de IC_{50} indica la cantidad de péptido necesaria para inhibir al 50% la actividad de la ECA, valores pequeños de este parámetro representan una mayor cantidad inhibitoria y, consecuentemente, un mayor potencial antihipertensivo.

La actividad IECA del extracto proteínico rico en BPE obtenido en el presente trabajo, es mejor que la reportada por Cú-Cañetas y col. (2005), quienes encontraron que las fracciones peptídicas provenientes de la hidrólisis enzimática de un concentrado proteico de *Vigna unguiculata*, presentaron un IC_{50} de 402 $\mu\text{g mL}^{-1}$. De igual forma, el extracto proteico obtenido aquí tuvo un

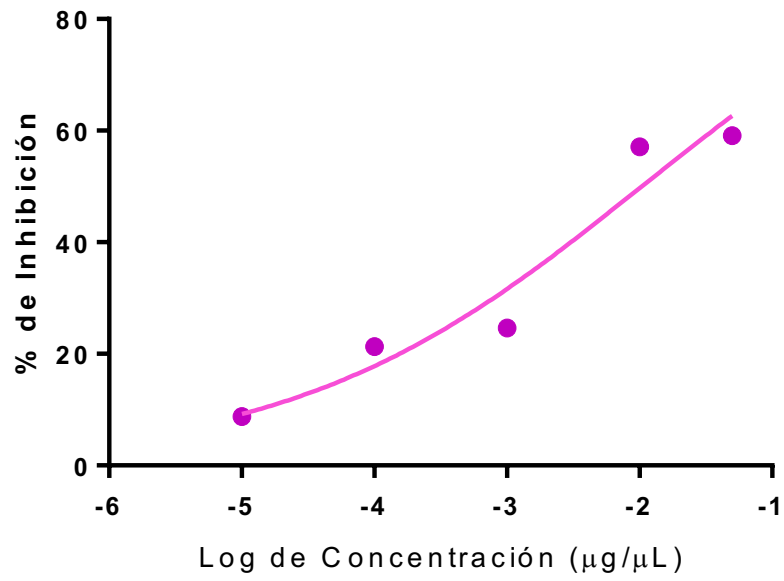


Figura 24. Curva de inhibición *in vitro* de ECA para el extracto proteínico rico en BPE.

valor de IC₅₀ mejor que el reportado por Rho y col. (2009) quienes en fracciones obtenidas de un extracto fermentado de soya determinaron un valor de IC₅₀ de 1120 µg. mL⁻¹. De igual forma en el análisis de una preparación *in vitro* de chícharos, el IC₅₀ de los péptidos fue de 720 µg. mL⁻¹; mientras que Jakubczyk y Baraniak (2014), reportaron valores de IC₅₀ para frijol común de 770 µg. mL⁻¹ y de 260 µg. mL⁻¹ para lentejas verdes.

Entre los fármacos antihipertensivos más comunes en el mercado, se encuentran los inhibidores de la ECA, los bloqueadores, los diuréticos y los bloqueadores de los receptores de angiotensina-II, los cuales han sido eficaces y bien tolerados en el tratamiento de la hipertensión. Sin embargo, diversas desventajas han sido reportadas por el uso prolongado de la mayoría de estos fármacos sintéticos. Por ejemplo, Baltar y col., (2004) reportaron que todos los fármacos usados para el tratamiento de la hipertensión arterial en el embarazo atraviesan la placenta, por lo que pueden afectar al feto indirectamente disminuyendo el flujo útero-placentario o directamente a través de la circulación umbilical. Por otro lado, Cooper y col. (2006) alertaron sobre el alto riesgo en el uso de inhibidores de la ECA como: Benazapril (Lotensin), Captopril (Capoten), Enalapril/Enalaprilat (Vasotec oral e inyectable), Fosinopril (Monopril), Lisinopril (Zestril y Prinivil), Moexipril (Univasc), Perindopril (Aceon), Quinapril (Accupril), Ramipril (Altace) y Trandolapril (Mavik), ya que, durante el primer trimestre de embarazo, puede estar asociado con el incremento de riesgo de malformaciones congénitas del recién nacido (Torruco-Uco y col. 2008). Además, McDowell y col. (2013) reportaron que los pacientes con una ingesta prolongada de antihipertensivos sintéticos, presentan problemas renales y elevan peligrosamente los niveles de potasio en la sangre, además de severos problemas cardiacos, lo cual coincide con lo reportado por Williams y col. (2019), quienes aseguran que entre los fármacos antihipertensivos diuréticos, calcioantagonistas, β-bloqueantes, y los bloqueadores de angiotensina se pueden presentar reacciones adversas tales

como: asma, enfermedad arterial periférica, síndrome metabólico, taquiarritmias, insuficiencia cardíaca, entre otras.

Todo lo anterior, se pone en manifiesto la gran importancia en el desarrollo de nuevos productos que puedan ayudar al tratamiento de la hipertensión arterial que no tengan efectos adversos para el paciente, siendo una alternativa oportuna los productos provenientes de fuentes naturales como el del extracto proteínico rico en BPE proveniente de la microalga roja *P. cruentum* desarrollado en el presente trabajo, ya que podría ser utilizado como una fuente natural de inhibidor de la ECA.

Además de la clorofila, las ficobiliproteínas son los pigmentos fotosintéticos de las microalgas que son capaces de mejorar la eficiencia de la utilización de energía, y protegerla de la radiación solar y los efectos relacionados a ella. Su función como antioxidantes en la microalga, también muestra una opción para su utilización como antioxidantes en los alimentos para consumo humano (Munir y col., 2013). Dicho esto, se puede concluir que el extracto proteínico obtenido en este trabajo puede ser utilizado no solo como un potencial colorante en alimentos, sino que además de adicionar color, aportará un efecto antioxidante en el consumidor.

IX CONCLUSIONES

1. Con base en las cinéticas de densidad celular y concentración de BPE del cultivo de la microalga *Porphyridium cruentum*, se logró establecer el día 15, como el óptimo para cosechar la biomasa producida.
2. Se estableció un método para la obtención de un extracto proteínico rico en BPE, que consiste en el calentamiento en placa a 50°C, por 30 min de una suspensión de biomasa a una concentración de 5% (p/v).
3. La caracterización electroforética confirmó que el extracto obtenido contiene mayoritariamente la BPE, con un tamaño de 150 kDa, la cual esta conformada por las subunidades α , β y γ .
4. El extracto proteínico rico en BPE obtenido a través del protocolo aquí descrito, mostró CAOX, por medio de los ensayos ABTS (892.70 $\mu\text{mol ET/g BPE}$), DPPH 1173.18 ($\mu\text{mol ET/g BPE}$) y FRAP (3755.82 $\mu\text{mol ET/g BPE}$).
5. El extracto proteínico rico en BPE, presentó actividad antihipertensiva *in vitro* mostrando un IC_{50} de 0.01039 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

X BIBLIOGRAFÍA

- Aberoumand A. 2011. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants and foodstuff and food industry. *World Journal of Dairy and Food Sciences* 6(1): 71-78.
- Aluko RE y Monu E. 2003. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *Journal of Food Science* 68(4): 1254-1258.
- Amate CF, Unterluggauer H, Fischer RJ, Fernández-Alba AR y Masselter S. 2010. Development and validation of a LC–MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins, dyes and pesticides in spices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397(1): 93–107.
- ANIQ. 2016. Capítulo 14: La industria de los pigmentos y colorantes. *Anuario estadístico*: 206-211.
- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis AOAC*. Gaithersburg, Montgomery.
- Arad MS, y Yaron A. 1992. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends in Food Science and Technology* 3(1): 92–96.
- Arredondo-Vega BO y Voltolina D. 2007. *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Centro de Investigaciones Biológicas S.C. La Paz, B.C.S., México. ISBN 968-5715-51-3. Capítulo 2.
- Arteni AA, Ajlani G y Boekema EJ. 2009. Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis sp.* strain PCC6803 and their interaction with the membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1787(4): 272-279.

- Arteni AA, Liu LN, Aartsma TJ, Zhang YZ, Zhou BC y Boekema EJ. 2007. Structure and organization of phycobilisomes on membranes of the red alga *Porphyridium cruentum*. *Photosynthesis Research* 95(2-3): 169-174.
- Arulselvi IP, Umamaheswari S, Sharma RG, Kartik C y Jayakrishna C. 2014. Screening of yellow pigment producing bacterial isolates from various eco-climatic areas and analysis of the carotenoid produced by the isolate. *Journal Food Process Technology* 5(1): 292.
- Atkinson AB y Robertson JIS. 1979. Captopril in the Treatment of Clinical Hypertension and Cardiac Failure. *The Lancet* 314(8147): 836-839.
- Ayyagari MS, Pande R, Kanstekar S, Gao H, Marx KA, Kumar J, Tripathy SK, Akkara JA y Kaplan DL. 1995. Molecular assembly of proteins and conjugated polymers: Toward development of biosensors. *Biotechnology and Bioengineering* 45(2): 116-121.
- Babitha S. 2009. Microbial pigments. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Springer Dordrecht: 147-162.
- Bacarizo-Roa JL. 2012. Cambios conformacionales de la B-ficoeritrina procedente de *Porphyridium cruentum* en función del pH. Tesis de Maestría. Universidad de Almería.
- Basaca-Loya GA, Valdez MA, Enriquez-Guevara EA, Gutiérrez-Millán LE y Burboa MG. 2009. Extraction and purification of B-phycoerythrin from the red microalga *Rhodospirillum rubrum*. *Ciencias Marinas* 35(4): 359-368.
- Batista AP, Raymundo A, Sousa I y Empis J. 2006. Rheological characterization of coloured oil-in-water food emulsions with lutein and phycocyanin added to the oil and aqueous phases. *Food Hydrocolloids* 20(1): 44–52.

- Becker W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition. Handbook of microalgal culture. Blackwell, Oxford: 312- 351.
- Becker W. 2007. Micro-algae as a source of protein. Biotechnology Advances 25(2): 207–210.
- Bei H, Guang-Ce W, Chen-Kui Z y Zhen-Gang L. 2002. The experimental research of R-phycoerythrin subunits on cancer treatment: a new photosensitizer in PDT. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals 17(1): 35-42.
- Benavides J y Rito-Palomares M. 2004. Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. Journal of Chromatography 807(1): 33-38.
- Benavides J y Rito-Palomares M. 2015. Potential aqueous two-phase processes for the primary recovery of colored proteins from microbial origin. Engineering in Life Science 5(3): 259–266.
- Benedetti S, Rinalducci S, Benvenuti F, Francogli S, Pagliarani S, Giorgi L, Micheloni M y Canestrari F. 2006. Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 833(1): 12-18.
- Bermejo R, Ación GF, Ibañez JM, Fernández JM, Molina E y Alvarez-Pez JM. 2003. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 790(1-2): 317-325.

- Bermejo R, Álvarez-Pez JM, Acién-Fernandez FG y Molina-Grima E. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. Journal of Biotechnology 93 (1): 73-85.
- Bermejo R, Avera EM y Álvarez-Pez JM. 2001. Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. Semipreparative HPLC separation and characterization of its subunits". Journal of Chromatography A 917(1-2): 135–145.
- Bermejo R, Ramos A, Cuesta R, Galvez N y Dominguez-Vera JM. 2011. 5th International Conference on Advanced Computational Engineering and Experimenting ACE-X. Libro de resúmenes: 168-169.
- Bernaerts TMM, Kyomugasho C, Looveren NV, Gheysen L, Foubert I, Hendickx ME y Van Loey AM. 2018. Molecular and rheological characterization of different cell wall fractions of *Porphyridium cruentum*. Carbohydrate Polymers 195: 542-550.
- Betancourt-Fernández L. 1997. Producción, purificación y caracterización de ficocianina de "*Synechococcus sp.* I09201" aislada en aguas de Cuba. Tesis doctoral. Universidad da Coruña. Facultad de ciencias.
- Bhat BV y Madyastha KM. 2000. C-Phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. Biochemical and Biophysical Research Communications 275: 20-25.
- Bishop W y Zubeck H. 2012. Evaluation of microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. Journal of Nutrition and Food Sciences 2(5): 1-6.
- Bold HC y Wynne MJ. 1985. Introduction to the algae: Structure and reproduction. Prentice-Hall, Incorporated.

- Borowitzka MA. 1988. Vitamins and Fine Chemicals from Microalgae. Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press: 153-196.
- Borowitzka MA. 2013. High-value products from microalgae—their development and commercialization. *Journal of Applied Phycology* 25(3): 743–756.
- Brennan L y Owende P. 2010. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(2): 557-577.
- Browning DF, Whitworth DE y Hodgson DA. 2003. Light induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: functional characterization of the ECF sigma factor CarQ and antisigma factor CarR. *Molecules Microbiology* 48(1): 237-251.
- Bryant DA, Guglielmi G, Tandeu de Marsac N, Castets AM y Cohen-Bazire G. 1979. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology* 123(2): 113-127.
- Cáceres-Aravena SO. 2009. Aislamiento y caracterización de las principales microalgas presentes en el sistema hidropónico del tipo raíz flotante. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile: 6-9.
- Camacaro J, Gómez J, Jiménez M, Vega C y Manganiello L. 2018. A liposoluble colorant from Annato sedes (*Bixa Orellana* L.) as an input for food industry. *Revista de Ingeniería UC* 25 (2): 291-306
- Camara-Artigas A, Bacarizo J, Andujar-Sanchez M, Ortiz-Salmeron E, Mesa-Valle C, Cuadri C, Martin-Garcia JM, Martinez-Rodriguez S, Mazzuca-Sobczuk T, Ibañez MJ y Allen JP. 2012. pH-dependent structural conformations of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Federation of European Biochemical Societies* 279(19): 3680–3691.

- Cao G, Alessio HM y Cutler RG. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 14(3): 303-311.
- Carmona I. 2013. De colorantes sintéticos a naturales en la industria alimentaria. Agrimundo, ODEPA, Ministerio de Agricultura Chile, Reporte 5: 1-6.
- Cervantes-Blanco Y, Ferrer-Romero JC, Vendrell-Calzadilla F y Fernández-Duarte G. 2017. Propuesta de ampliación de la capacidad productiva del proceso de obtención de la proteína β -ficoeritrina. *Tecnología Química* 37(2): 322-338.
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from Microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3): 294-306.
- Cisneros-Ruiz M y Rito-Palomares M. 2015. Estrategias de bioingeniería para la recuperación primaria de productos biológicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 4: 131-139.
- Cú-Cañetas T, Betancur-Ancona D, Gallegos-Tintoré S, Sandoval-Peraza M y Chel-Guerrero L. 2015. Estudios de inhibición *in vitro* de la enzima convertidora de angiotensina-I, efectos hipotensor y antihipertensivo de fracciones peptídicas de *V. unguiculata* *Nutrición Hospitalaria* 32(5): 2117-2125.
- Cuellar-Bermúdez SP, Aguilar-Hernandez I, Cardenas-Chavez DL, Ornelas-Soto N, Romero-Ogawa MA y Parra-Saldivar R. 2015. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Technology* 8(2): 190–209.
- De-Bashan LE y Bashan Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource Technology* 101(6): 1611-1627.

- Del Pilar Sánchez-Saavedra M, Castro-Ochoa FY, Nava-Ruiz VM, Ruiz-Güereca DA, Villagómez-Aranda AL, Siqueiros-Vargas F y Molina-Cárdenas CA. 2018. Effects of nitrogen source and irradiance on *Porphyridium cruentum*. *Journal Applied Phycology* 30(2): 783–792.
- Dharmaraj S, Ashokkumar B y Dhevendaran K. 2009. Food-grade pigments from *Streptomyces* sp. isolated from the marine sponge *Callyspongia diffusa*. *Food Research International* 42(4): 487-492.
- Doke JM. 2005. An improved and efficient method for the extraction of phycocyanin from *Spirulina* sp. *International Journal of Food Engineering* 1(5): 2-11.
- Downham A y Collins P. 2000. Colouring our foods in the last and the next millennium. *International Journal of Food and Science Technology* 35(1): 5-22.
- Dufosse L, Fouillaud M, Caro Y, Mapari SAS y Sutthiwong N. 2014. Filamentous fungi are large scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 56-61.
- Dufossé L, Galaup P, Yaron A, Aarad SM Blanc P, Chidambara-Murthy KN y Ravishankar GA. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. *Trends in Food Science & Technology* 16(9): 389-406.
- Dupré C, Guary JC y Grizeau D. 1994. Effect of photon fluence rate, nitrogen limitation and nitrogen recovery on the level of phycoerythrin in the unicellular alga, *Rhodospirillum rubrum* Rhodospirillales. *Plant Physiology* 92(3): 521–527.
- Eriksen NT. 2008. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80(1): 1–14.

- Espinoza-Escalante FM. 2017. Microalgas en la alimentación ¿Suplementos novedosos o reinventados?. *Ciencia* 68(2): 2-5.
- Estrada DMM, Guerrero LC, Ancona DB y Escalante VH. 2012. Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I con hidrolizados proteicos de *Jatropha curcas*. *Acta de Bioquímica Clínica Latinoamericana* 46(3): 385-392.
- Fuentes MR, Fernández GA, Pérez JS y Guerrero JG. 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry* 70(3): 345-353.
- Galland-Irmouli AV, Pons L, Lucon M, Villaume C, Mrabet NT, Guéant JL y Fleurence J. 2000. One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 739(1): 117-123.
- Gantt E y Conti SF. 1965. The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*. *Journal Cell Biology* 26(2): 365-381.
- Germán-Báez LJ, Cruz-Mendivil A, Medina-Godoy S, Milán-Carrillo J, Reyes-Moreno C y Valdez-Ortiz A. 2014. Expression of an engineered acidic-subunit 11S globulin of amaranth carrying the antihypertensive peptides VY, in transgenic tomato fruits. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 118 (2): 305-312
- German-Báez LJ, Valdéz-Flores MA, Félix-Medina JV, Norzagaray-Valenzuela CD, Santos-Ballardo DU, Reyes-Moreno C, Shelton LM y Valdez-Ortiz A. 2017. Chemical composition and physicochemical properties of *Phaedactylum triconurtum* microalgal residual biomass. *Food Science and Technology International* 23 (8): 681-689.

- Ginzberg A, Cohen M, Sod-Moriah UA, Shany S, Rosenshtrauch A, y Arad S. 2000. Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium* sp. have reduced blood cholesterol levels and modified fatty acids composition in egg yolk. *Journal of Applied Phycology* 12(3): 325-330.
- Glazer AN. 1976. The biliproteins. Academic Press, New York 11: 1-103.
- Glazer AN. 1994. Phycobiliproteins – a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology* 6(2): 105-112.
- Godoy-Hernández G y Vázquez-Flota FA. 2006. Growth measurements: estimation of cell division and cell expansion. *Plant Cell Culture Protocols* 51-58.
- Goiris K, Muylaert K, Fraeye I y Foubert I. 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology* 24: 1477–1486.
- Golueke CG y Oswald WJ. 1961. The mass culture of *Porphyridium cruentum*. *Applied and Environmental Microbiology* 10(2): 102-107.
- Gómez-Luna L. 2007. Microalgas: Aspectos Ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química* 19(2): 3-20.
- González-Muñoz JA. 2007. Evaluación del crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Porphyridium cruentum* (rhodophyceae) cultivada con medio f2 y fertilizantes agrícolas. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada: 1-64
- González R, Rodríguez S, Romay C, González A, Armesto J, Ramirez D y Merino N. 1999. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacological Research* 39(1): 55-59.

- Gouveia L, Marques A, Sousa J, Moura P y Bandara N. 2010. Microalgae- Source of natural bioactive molecules as functional ingredients. Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods 7(2): 21-37.
- Grand View Research. 2017. Specialty food ingredients market size, share and trends analysis report by product sensory (enzymes, emulsifiers, flavors and colorants) and Functional (vitamins, minerals, antioxidants, preservatives) and segment forecast, 2018-2025. URL <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/specialty-food-ingredients-market>. Consultada en diciembre del 2019.
- Gualteri P, Barsanti L y Passarelli V. 1988. Harvesting *Euglena gracilis* cells with a nontoxic flocculant. Journal of Microbiological Methods 8(6): 327-332.
- Gudin C y Thepenier C. 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. Advances in Biotechnological Processes 6: 73-110.
- Guedes AC, Amaro HM y Malcata FX. 2011. Microalgae as sources of carotenoids. Marine Drugs 9(4): 625–644.
- Guerrero MG y Losada M. 1989. Producción fotosintética de compuestos de interés práctico por microalgas. Colección Nuevas Tendencias, CSIC, Madrid.
- Guillard RR y Ryther JH. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology 8(2): 229–239.
- Hameed MA. 2007. Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal. African Journal of Biotechnology 6(10): 1185-1191.

- Hari RK, Patel TR y Martin AM. 1994. An overview of pigment production in biological systems: functions, biosynthesis and applications in food industry. *Food Reviews International* 10(1): 49-70.
- Harith ZT, Yusoff FM, Mohamed MS, Shariff M, Din M y Ariff AB. 2009. Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. *African Journal of Biotechnology* 8(21): 5971-5978.
- Hemmi H, Ikejiri S, Nakayama T y Nishino T. 2003. Fusion-type lycopene β -cyclase from a thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305(3): 586-591.
- Heer K y Sharma S. 2017. Microbial pigments as a natural color: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 8(5): 1913-1922.
- Hernández-Pérez A y Labbé JI. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49(2): 62-73.
- Hu CC, Lin JT, Lu FJ, Chou FP y Yang DJ. 2008. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry* 109(2): 439–446.
- Jakubczyk A y Baraniak B. 2014. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Obtained after *in vitro* Hydrolysis of Pea (*Pisum sativum* var. Bajka) Globulins. *Biomed Research* 2014: 1–8.
- Janta K, Pekkoh J, Tonasiri S, Pumas C y Peerapornpisal Y. 2013. Selection of some native microalgal strains for possibility of bio-oil production in Thailand. *Journal of Scientific Society* 40(4): 593-602.

- Jiang Y, Li HB, Chen F y Hyde KD. 2005. Production potential of water-soluble *Monascus* red pigment by a newly isolated *Penicillium* sp. *Journal of Agriculture Technology* 1(1): 113-126.
- Juin C, Chérouvrier JR, Thiéry V, Gagez AL, Bérard JB, Joguet N, Kaas R, Cadoret JP y Picot L. 2014. Microwave-assisted extraction of phycobiliproteins from *Porphyridium purpureum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175(1): 1-15.
- Kamble SP, Vikhe GP y Chamble DR. 2018. Extraction and purification of phycoerythrin- A natural colouring agent from *Spirulina plantensis*. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences* 6(2): 78-84.
- Kathiresan S, Sarada R, Bhattacharya S y Ravishankar GA. 2007. Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum*. *Biotechnology and Bioengineering* 96(3): 456-463.
- Kaur S, Khattar JIS, Yadvinder-Singh, Ahluwalia AS. 2019. Extraction, purification and characterization of Phycocyanin from *Anabaena fertilissima* PUPCCC 410.5: as a natural and food grade stable pigment. *Journal of Applied Phycology* 31: 1685-1696
- Kent M, Welladsen HM, Mangott A y Li Y. 2015. Nutritional Evaluation of Australian Microalgae as Potential Human Health Supplements. *PLOS ONE* 10(2): e0118985.
- Kidanemariam TK, Tesema TK, Asressu KH y Boru AD. 2013. Chemical Investigation of *Lawsonia inermis* L. Leaves from Afar Region, Ethiopia . *Oriental Journal of Chemistry* 29(3): 1129-1134.

- Knuckey R, Brown MR, Robert R y Frampton DM. 2006. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering* 35(3): 300-313.
- Kobylewski S y Jacobson MF. 2010. *Food Dyes: A Rainbow of Risks*. Center for Science in the Public Interest.
- Kumar A, Vishwakarma HS, Singh J, Dwivedi S y Kumar M. 2015. Microbial pigments: production and their applications in various industries. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Science* 5(1): 203-212.
- Lastra-Marín. 2016. La voz del norte. "Mercado de colorantes, pigmentos y tintes naturales". La voz del norte periódico cultural de Sinaloa. URL: www.lavozdelnorte.com.mx/2016/08/31/mercado-de-colorantes-pigmentos-y-tintes-naturales/. Consultada en septiembre de 2019.
- Leney AC, Tschanz A y Heck AJR. 2018. Connecting color with assembly in the fluorescent B-phycoerythrin protein complex. *The Federation of European Biochemical Societies Journal* 285(1): 178-187.
- Li HB, Jiang Y y Chen F. 2002. Isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by extraction after saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(5): 1070–1072.
- Liang S, Xueming L, Chen F y Chen Z. 2004. Current microalgal health food R & D activities in China. *Asian pacific phycology in the 21st century: prospects and challenges*. *Developments in Hydrobiology* 173: 45- 48.
- Liu LN, Chen XL, Zhang YZ y Zhou BC. 2005. Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1708(2): 133-142.

- Lodoño-Lodoño J. 2012. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Desarrollo y transversalidad serie Lasallista Investigación y ciencia: 130-162
- Lora-Vilchis MC, Felix MV, López-Fuerte FO y Arredondo-Vega BO. 2017. ¿Conservar fitoplancton vivo? Cepario de microalgas del CIBNOR. Recursos Naturales y Sociedad 2(2): 40-55.
- Lowenstein J. 1986. The secret life of seaweeds. Oceans Journal 19: 72-75.
- Lubian LM. 1989. Concentrating cultured marine microalgae with chitosan. Aquaculture Engineering 8(4): 257-265.
- Manikprabhu D y Li WJ. 2015. Antimicrobial agents from actinomycetes Chemistry and applications. Antimicrobials Synthetic and Natural Compounds 8(1113): 99–116.
- Manirafasha E, Ndikubwimana T, Zeng X, Lu Y y Jing K. 2016. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. Biochemical Engineering Journal 109: 282–296.
- Mapari SA, Nielsen KF, Larsen TO, Frisvad JC, Meyer AS y Thrane U. 2005. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. Current Opinion in Biotechnology 16(2): 231-238.
- Marín-Castillo SE y Mejía-Castillo CM. 2012. Extracción de colorante a partir de la flor de Jamaica. Tesis doctoral. Universidad Nacional de ingeniería. Facultad de ingeniería química.
- Markets y Markets. 2018. Food Colors Market by Type (Natural, Synthetic, Nature-Identical), Application (Beverages, Processed Food, Bakery &

Confectionery Products, Oils & Fats, Dairy Products, Meat, Poultry, Seafood), Form, Solubility, and Region - Global Forecast to 2023. URL: www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/food-colors-market-36725323.html. Consultada en septiembre 2019

Martek Corporation. 2005. URL: <http://www.marketbio.com>. Consultada en Mayo de 2018.

Martelli G, Folli C, Visai L, Daglia M. y Ferrari D. 2013. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina plantensis* for food industry applications. *Process Biochemistry* 49(1): 154-159.

Martín JB, Iranzo RM y Grande JÁ. 2004. Toxicidad Fetal de los Fármacos Antihipertensivos. *Hipertensión y Riesgo Vascular* 21(9): 455-465.

Martínez-Silva AS. 2010. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* chlorophyta:volvocales. cultivada en diferentes medios. Tesis de Doctorado en Tecnología Avanzada, Instituto Politécnico Nacional: 17-24.

Matsui MS, Muizzuddin N, Arad S y Marenus K. 2003. Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties *in vitro* and *in vivo*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 104(1): 13-22.

McDowell SE, Thomas SK, y Coleman JJ. 2013. A practical guide to monitoring for adverse drug reactions during antihypertensive drug. *Journal of the Royal Society of Medicine* 106(3): 87-95.

Mintel and Leatherhead Food Research. 2011. The Global Market for Food Colours. URL: store.mintel.com/food-colours-international-february-2013?ga=2.214521495.1835350022.1568676673-261387318.1568676673. Consultada en septiembre del 2019.

- Munir N, Sharif N, Shagufta N y Manzoor F. 2013. Algae: a potent antioxidant source. *Sky Journal of Microbiology Research* 1(3): 22-31
- Moraes CC, De Medeiros Burkert JF y Kalil SJ. 2010. C-phycoerythrin extraction process for large-scale use. *Journal of Food Biochemistry* 34(1): 133–148.
- Morones-Ramirez JR, Alvarado V, Flores OL, Menchaca DN, Villareal-Chiu JF y Cantú ME. 2017. Colorantes y pigmentos microbianos en la belleza cosmética. *Revista Digital Universitaria UNAM* 16(4) 1-17.
- Najdenski HM, Gigova LG, Iliev II, Pilarski PS, Lukavsky J, Tsvetkova IV, Ninova MS y Kussovski VK. 2013. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International Journal of Food Science and Technology* 48: 1533-1540.
- Norzagaray-Valenzuela CD, Valdez-Ortiz A, Shelton LM, Jiménez-Edeza M, Rivera López J, Valdez-Flores M y Germán-Báez LJ. 2017. Residual biomasses and protein hydrolysates of three green microalga species exhibit antioxidant and anti-aging activity. *Journal Applied Phycology* 29: 189-198.
- Norzagaray-Valenzuela CD, Germán-Báez LJ, Valdez-Flores MA, Hernández-Verdugo S, Shelton LM, Valdez-Ortiz A. 2018. Establishment of an efficient genetic transformation method in *Dunaliella tertiolecta* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Microbiological Methods* 150:9-17.
- Oh SH, Han JG, Kim Y, Ha JH, Kim SS, Jeong MH, Jeong HS, Kim NY, Cho JS, Yoon WB, Lee SY, Kang DH y Lee HY. 2009. Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108 (5): 429-434.
- Ong LJ, Glazer AN y Waterbury JB. 1984. An unusual phycoerythrin from a marine cyanobacterium. *Science* 224(4644): 80-83.

- Paes C, Faria GR, Tinoco N, Castro D, Barbarino E y Lourenco S. 2016. Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation. *Latin American Journal of Aquatic Research* 44(2): 275-292.
- Pandey VD, Pandey A y Sharma V. 2013. Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 2: 89-97.
- Park PK, Kim EY y Chu KH. 2007. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology* 53(2): 148-152.
- Parra-Ortega VP. 2004. Estudio comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico. Tesis para Licenciado en Ciencias Biológicas. Universidad Austral de Chile.
- Patil V, Tran KQ y Giselrod HR. 2008. Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *International Journal of Molecular Sciences* 9(7): 1188-1195.
- Patterson G. 1996. Biotechnological applications of cyanobacteria. *Journal of Scientific and Industrial Research* 55: 669–684.
- Pino MT, Zamora O. Colorantes naturales de alto valor, una tendencia que crece en la industria de los alimentos. *Tierra adentro: Alimentos saludables*: 75-77.
- Pittman JK, Dean AP y Osudenko O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology* 102(1): 17-25.

- Plasencia Vázquez AH, Villegas P, Ferrer-Sánchez Y y Zamora-Crescencio P. 2017. Distribución histórica de las especies del género *Haematoxylum* (Leguminosae) en la Península de Yucatán, México, basada en ejemplares de herbario. *Acta Botanica Mexicana* 119: 51-68.
- Pulz O y Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(6): 635–648.
- Raja R, Hemaiswarya S, Kumar NA, Sridhar S y Rengasamy R. 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Review in Microbiology* 34(2): 77-88.
- Ramos A, Ación FG, Fernández-Sevilla JM, González CV y Bermejo R. 2010. Large-scale isolation and purification of C-phycoerythrin from cyanobacteria *Anabaena marina* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85(6): 783-792.
- Ramos A, Ación FG, Fernández-Sevilla JM, González CV y Bermejo R. 2011. Development of a process for large-scale purification of C-phycoerythrin from *Synechocystis aquatilis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 879(7-8): 511-519.
- Rao N, Prabhu M, Xiao M y Li WJ. 2017. Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications. *Frontiers in Microbiology* 8(1113): 1-13.
- Rashid N, Rehman S, y Han J. 2013. Rapid harvesting of fresh water microalgae using chitosan. *Process Biochemistry* 48(7): 1107-1110.
- Razhagui A, Godhe A y Albers E. 2013. Effects of nitrogen on growth and carbohydrate formation in *Porphyridium cruentum*. *Central European Journal*

of Biology 9 (2): 156-162

Redlinger T y Gantt E. 1982. A Mr 95,000 polypeptide in *Porphyridium cruentum* phycobilisomes and thylakoids: Possible function in linkage of phycobilisomes to thylakoids and in energy transfer. Proceedings of National Academy of Sciences 79(18): 5542-5546.

Rho SJ, Lee JS, Chung YI, Kim YW y Lee HG. 2009. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. Process Biochemistry 44(4): 490-493.

Richmond A. 2004. Biological principles of mass cultivation. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology 7: 125-177.

Rilling HC. 1962. Photoinduction of carotenoid synthesis of a Mycobacterium sp. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 60(3): 548-556.

Rimbau V, Camins A, Pubill D, Sureda FX, Romay C, González R, Jiménez A y Pallàs M. 2001. C-phycoerythrin protects cerebellar granule cells from low potassium/serum deprivation-induced apoptosis. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 364(2): 96-104.

Rivera-Talamantes AV. 2014. Propiedades ópticas de la microalga *Porphyridium cruentum* en diferentes etapas de crecimiento. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

Román RB, Alvarez-Pez JM, Fernández FA y Grima EM. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. Journal of Biotechnology 93(1): 73-85.

- Romay CH, Gonzalez R, Ledón N, Ramirez D y Rimbau V. 2003. C-Phycocyanin; A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein & Peptide Science* 4(3): 207–216.
- Romero T y Ferrán C. 2001. Floculación de *Chlorella* sp. Con la utilización de quitosana. *Revista de Investigación Marina* 22(1): 57-62.
- Rowan KS. 1989. The biliproteins. *Photosynthetic pigments of algae*. Cambridge University Press, New York: 166-210.
- Roy S, Llewellyn C, Egeland ES, y Johnsen G. 2011. *Phytoplankton pigments: Characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. Cambridge University Press.
- Ruiz-Ortega E. 2012. Obtención y purificación de ficoeritrina mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido. Escalado del proceso, caracterización fisicoquímica y aplicación como colorante natural. Tesis doctoral. Escuela politécnica superior de linares. Universidad de Jaén.
- Salazar-Pérez LE. 2012. Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. Tesis de Licenciatura en Ingeniería, Universidad de Piura: 25-39.
- Salem MA, Al-Ghonemiy AF, y Zaki AB. 2009. Photocatalytic degradation of allura red and quinoline yellow with polyaniline/TiO₂ nanocomposite. *Applied Catalysis B: Environmental* 91(1-2): 59–66.
- Santos-Ballardo DU, Rossi S, Hernández V, Vázquez-Gómez R, Rendón-Unceta MC, Caro-Corrales J y Valdez-Ortiz A. 2015. A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. *Aquaculture* 448: 87-92.

- Saracco-Alvarez MR. 2007. Compuestos con actividad antibacterial producidos por las microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 54 pp.
- Schoenleber RW, Lundell DJ, Glazer AN y Rapoport H. 1984. Bilin attachment sites in the alpha and beta subunits of B-phycoerythrin. Structural studies on the singly linked phycoerythrobilins. *Journal of Biological Chemistry* 259(9): 5485-5489.
- Seefeldt LC. 2007. Utah group plans to make biodiesel from algae. *Industrial Bioprocess* 29(5): 5–6.
- Sen T, Barrow CJ y Deshmukh SK. 2019. Microbial Pigments in the Food Industry Challenges and the Way Forward. *Frontiers in Nutrition* (6): 7. 1-14
- Sekar S y Chandramohan M. 2008. Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology* 20(2): 113–136.
- Singh JS, Pandey VC y Singh DP. 2011. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 140(3-4): 339–353.
- Sonani RR, Rastogi RP, Joshi M y Madamwar D. 2015. A stable and functional single peptide phycoerythrin (15.45 kDa) from *Lyngbya sp.* A09DM. *International Journal of Biological Macromolecules* 74: 29-35.
- Sonani RR, Rastogi RP, Patel R y Madamwar D. 2016. Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World Journal of Biological Chemistry* 7(1): 100-109.

- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E y Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2): 87–96.
- Stadnichuk IN y Tropin IV. 2016. Phycobiliproteins: Structure, functions and biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Microbiology* 53(1): 1–10.
- Steward N, Martin R, Engasser JM y Goergen JL. 1999. A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. *Plant Cell Reports* 19(2): 171-176.
- Stolz P y Obermayer B. 2005. Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmetics Toiletries* 120: 99-106.
- Sun L, Wang S y Qiao Z. 2006. Chemical stabilization of the phycocyanin from *Spirulina plantensis*. *Journal of Biotechnology* 121(4): 563- 569.
- Takano H, Asker D, Beppu T y Ueda K. 2006. Genetic control for light-induced carotenoid production in nonphototrophic bacteria. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology* 33(2): 88-93.
- Tang JZ, Ju B, Li W, Wen S, Pu Y y Qin S. 2016. One-step chromatographic procedure for purification of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*, *Protein Expression and Purification* 123: 70-74.
- Torruco-Uco, JG, Dominguez-Magaña MA, Dávila-Ortiz G, Martínez-Ayala A, Chel-Guerrero LA y Betancur-Ancona DA. 2008. Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 6(2): 158-168.

- Tortora GJ, Berdell RF y Case CL. 2007. Introducción a la microbiología. Ed. Médica Panamericana: 9-177.
- Transparency Market Research. 2012. Food Colors Market- Global Industry Size, Market Share, Trend, Analysis, And Forecasts 2012-2018. URL: www.transparencymarketresearch.com/food-colors-market.html. Consultada en septiembre del 2019.
- Turkcan O y Okmen G. 2012. Microbial Carotenoids. Turkish Journal of Science Review 5(1): 115-122.
- Valduga E, Tatsch PO, Tiggemann L, Treichel H, Toniazzo G, Zeni J, Di Luccio M y Fúrigo-Júnior A. 2009. Produção de Carotenoides: Microrganismos Como Fonte De Pigmentos Naturais. Química Nova 32(9): 2429-2436.
- Verma NM, Mehrotra S, Shukla A y Mishra BN. 2010. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. African Journal of Biotechnology 9(10): 1402-1411.
- Velázquez-Arellano ME, Benavente-Valdés JR, Morlett-Chávez JA, y Aguilar-González CN. 2016. Pigments production by *Monascus* spp. In solid medium using agroindustrial waste. Investigación y Ciencia 24 (69): 89-95.
- Vonshak A. 1988. *Porphyridium*. Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge: 122-134.
- Yagilar F y Yildiz PO. 2016. The final development related microbial pigments and the application in food industry. Erzincan University Journal of Science and Technology 9(2): 118-142.
- Willian B, Mancía G, Spiering W, Abgabiti-Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, De Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J,

Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, y Desormais I. 2018. Guía ESC/ ESH 2018 sobre el diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial. *Revista Española de Cardiología* 72 (2): 1-78.

Yokoyama A y Miki W. 1995. Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the *Agrobacterium aurantiacum*. *FEMS Microbiology Letters* 128(2):139-144.

You T y Barnett SM. 2004. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochemical Engineering Journal* 19: 251-258.

Zhao LS, Li K, Wang QM, Song XY, Su HN, Xie BB, Zhang XY, Huang F, Chen XL y Zhou BC. 2017. Nitrogen Starvation Impacts the Photosynthetic Performance of *Porphyridium cruentum* as Revealed by Chlorophyll a Fluorescence. *Scientific Reports* 7(1): 1-11

Zhou B, Wang J, Pu Y., Zhu M, Liu S y Liang S. 2009. Optimization of culture medium for yellow pigments production with *Monascus anka* mutant using response surface methodology. *European Food Research and Technology* 228(6): 895-901.

Zhou M, Cai C, Liu J, Wang Q, Wu W y He P. 2010. Optimization of IgG conjugation with R-phycoerythrin from *Porphyra yezoensis*. *Journal of Applied Phycology* 22(4): 459-464.

XI ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
APC	Aloficocianina
BM	Biomasa
BPE	Beta-ficoeritrina
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
EPA	Ácido Eicosapentanoico
g L⁻¹	Gramos por litro
kDa	Kilo Daltons
M	Molar
Mg	Miligramos
mg L⁻¹	Miligramos por litro
mg mL⁻¹	Miligramos por mililitro
Min	Minutos
µg.µL⁻¹	Microgramos por microlitro
µmolET	Micromol equivalente de Trolox
µM	Micromolar
mM	Milimolar
Nm	Nanómetros
p/v	Peso/volumen
PCB	Ficocianobilina
PE	Ficoeritrina
PEB	Ficobilinas
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
v/v	Volumen/volumen

Vit
β-PE

Vitamina
Beta ficoeritrina

XII ANEXOS

ANEXO 1. Composición del medio F/2

Para preparar el medio F/2 se agregan 1 mL de cada solución previamente esterilizada en autoclave a 121°C, 12 kg.cm³ por 20 min en un litro de agua salada (3.4%, p/v) estéril. La solución de elementos traza y vitaminas se describen a continuación.

Componente	Solución patrón	Cantidad	Concentración molar en el medio
NaNO ₃	75 g.L ⁻¹	1 mL	8.82 x 10 ⁻⁴ M
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	5 g.L ⁻¹	1 mL	3.62 x 10 ⁻⁵ M
Na ₂ SiO ₃ . 9H ₂ O	30 g.L ⁻¹	1 mL	1.06 x 10 ⁻⁴ M
Metales traza	Ver descripción en anexo 2	1 mL	--
Vitaminas	Ver descripción en anexo 3	1 mL	--

ANEXO 2. Solución patrón de metales traza

Para preparar la solución patrón de metales traza, en 950 mL de agua destilada, se agregan los componentes: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se disuelven completamente, posteriormente se agrega 1 mL de cada solución previamente preparada a la concentración dada, y finalmente se lleva a un volumen final de 1000 mL. La solución patrón se esteriliza en autoclave a 121°C , $12 \text{ kg}\cdot\text{cm}^3$ por 20 min y posteriormente se almacena a 4°C .

Componente	Solución patrón	Cantidad	Concentración molar en el medio
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	--	3.5 g	$1.17 \times 10^{-5} \text{ M}$
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	--	4.36 g	$1.17 \times 10^{-5} \text{ M}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$9.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	1 mL	$3.93 \times 10^{-5} \text{ M}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$6.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	1 mL	$2.60 \times 10^{-8} \text{ M}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$22.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	1 mL	$7.65 \times 10^{-8} \text{ M}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	1 mL	$4.20 \times 10^{-8} \text{ M}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$180.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	1 mL	$9.10 \times 10^{-7} \text{ M}$

ANEXO 3. Solución patrón de vitaminas

Para preparar la solución patrón, primero se disuelve la tiamina en 950 mL de agua destilada, y posteriormente se agrega 1 mL de solución patrón de biotina y de cianocobalamina. Finalmente se lleva a un volumen final de 1000 mL con agua destilada. Se filtroesteriliza y se almacena a 4°C bajo condiciones de oscuridad.

Componente	Solución patrón	Cantidad	Concentración molar en el medio
Tiamina HCl (Vit. B1)	--	200 mg	2.96×10^{-7} M
Biotina (Vit. H)	1.0 g.L ⁻¹	1 mL	2.05×10^{-9} M
Cianocobalamina (Vit. B12)	1.0 g.L ⁻¹	1 mL	3.69×10^{-10} M