

FICOCIANINA

Hoy en día existen muchos colorantes como aditivos en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, así como en las investigaciones biomédicas y de diagnóstico clínico. Los colorantes se dividen en dos grandes grupos: naturales y sintéticos. El uso de estos últimos está ampliamente difundido en la industria alimentaria debido a que son solubles en agua, económicos, permiten la combinación de colores, son estables y fáciles de usar. Sin embargo, estos colorantes presentan un alto efecto tóxico, alergénico e incluso carcinógeno, por lo que han obligado a la industria a buscar otras alternativas que mantengan el color de los alimentos. Por este motivo, actualmente están reemplazando los colorantes sintéticos por colorantes de origen natural (Pigmentos naturales). A pesar de las ventajas que presenta el uso de colorantes naturales, tanto la cantidad como la gama de colores son escasos en relación con las necesidades reales de los tipos de industrias que las requieren. Los colorantes naturales que se obtienen a partir de organismos vivos se denominan biocolorantes, siendo muy escasos y la mayoría son poco estables a las condiciones de tratamiento térmico y conservación. Una de las fuentes más importantes son las microalgas, con un gran interés debido a su aplicación como fuente natural de pigmentos, lípidos, ácidos grasos, proteínas, polisacáridos y compuestos fenólicos. De ellas se pueden obtener pigmentos naturales, como los que se encuentran en las ficobiliproteínas.

El uso de cualquier colorante natural requiere un conocimiento detallado de su estabilidad, con el fin de optimizar la producción industrial, embalaje y almacenamiento de los productos coloreados.

La cianobacteria *Arthrospira* conocida como Espirulina, posee un pigmento de importancia comercial. Este pigmento es la Ficocianina, la cual tiene propiedades benéficas para el ser humano. Estas propiedades son:

Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas son macromoléculas biológicas cuya estructura está formada por un complejo de proteína y un grupo cromóforo. Estos cromóforos, denominados ficobilinas, están formados por un grupo prostético tetrapirrólico lineal, que en su estado funcional está enlazado covalentemente a residuos de cisteína específicos de la proteína. Estas macromoléculas presentan color, por lo que sus máximos de absorción se encuentran en la zona visible del espectro.

Existen varios tipos de ficobiliproteínas con una absorción y fluorescencia específica, que viene dada por la interacción entre las ficobilinas y las cadenas polipeptídicas (cadena α , β y γ) mediante enlaces covalentes. Las cadenas α , β y γ pueden formar agregados tales como dímeros, trímeros o hexámeros. El estado de agregación de la ficobiliproteína depende de la fuerza iónica, del pH, la temperatura, la presencia de agentes desnaturizantes, composición del tampón y concentración de la proteína.

Según sus propiedades espectroscópicas, las ficobiliproteínas se dividen en cuatro grandes grupos:

Ficoeritrinas (PE): con máximos de absorción entre 540-570 nm. Presentan un color rojo o naranja fluorescente. En este grupo se pueden encontrar dos tipos de ficobilinas, la ficoeritrobilina (PEB) y la ficourobilina (PUB). Tienen dos o tres ficobilinas en la subunidad α y tres en la subunidad β .

Ficocianinas (PC): cuyos máximos de absorción se encuentran entre 610-620 nm. Se caracterizan por su color azul debido a la ficocianobilina (PCB), su cromóforo. Tienen un cromóforo en la subunidad α y dos en la subunidad β . La R-Ficocianina es una ficocianina especial que además de PCB posee PEB.

Aloficocianinas (APC): sus máximos de absorción están entre 650-655 nm. Poseen un color púrpura y su cromóforo es la ficocianobilina (PCB). Tienen un PCB en la subunidad α y otro en la subunidad β .

Ficoeritrocianinas (PEC): con máximos de absorción entre 570 y 595 nm. Solamente unas pocas cianobacterias presentan este grupo. Sus cromóforos son PCB y ficobiliviolina (PXB).

Esta clasificación está relacionada con el número y especies de ficobilinas que contienen en su estructura. El color y las características de absorción de estas ficobiliproteínas viene dado por el tipo de cromóforo unido a la proteína y la forma en la que estos se enlazan (Glazer, 1984).

Las ficobiliproteínas se encuentran principalmente en las cianobacterias (conocidas como algas verdes azuladas) como *Espirulina*. En estos microorganismos actúa como accesorio fotosintético, es decir, absorben luz en un amplio intervalo de longitud de onda del espectro visible y transfieren la energía de excitación, mediante procesos no radiativos, hacia los centros de reacción situados en las membranas fotosintéticas donde se convierte en energía química.

En el interior de las cianobacterias, las ficobiliproteínas forman agregados moleculares, denominados ficobilisomas. Estos se encuentran en la superficie de las membranas tilacoidales y actúan como pigmentos antena que absorben la luz y canalizan la energía de excitación.

Su estructura está formada por un núcleo central constituido por tres cilindros. Cada uno de estos está comprendido por cuatro discos apilados y seis varillas radiales que parten del núcleo central, cada una de las cuales está compuesta por varios discos apilados. El 85 % de estos ficobilisomas están compuestos por ficobiliproteínas, las cuales se organizan en orden a su máxima absorción, es decir, ficoeritrinas en la periferia, ficocianinas en el centro y aloficocianinas muy cerca de los centros de reacción en la membrana tilacoidal.

Ficocianina

La ficocianina es uno de los cuatro grandes grupos en los que se dividen las ficobiliproteínas según sus propiedades espectroscópicas. Se encuentra como una mezcla compleja de monómeros, trímeros, hexámeros y otros oligómeros. Su masa molecular varía de 44 a 260 kDa (Chaiklahan *et al*, 2012). La masa molecular, la posición y la intensidad del máximo de absorción de la ficocianina dependen del estado de agregación, que se encuentra influenciado por parámetros tales como el pH de la disolución, la temperatura, la concentración de la proteína y el origen de alga de la que procede.

Se distinguen dos tipos de ficocianinas:

C-Ficocianina: cuyo cromóforo se denomina ficocianobilina (PCB) ($C_{33}H_{38}N_4O_6$), responsable del color azul que es característico de esta proteína. Este se encuentra tres veces en su estructura, uno de ellos unido a la cisteína 84 de la cadena α y los otros dos a las cisteínas 84 y 155 de la cadena β . Tiene un máximo de absorción entre 615-620 nm. La ficocianobilina, es un compuesto prostético tetrapirrólico lineal unido covalentemente mediante enlaces tioéter a residuos específicos de cisteína, propios de la cadena polipeptídica de dicha proteína.

Figura 2: Estructura de la ficocianobilina (PCB).

R-Ficocianina: es una ficocianina especial, ya que además de la ficocianobilina posee también la ficoeritrobilina.

Una de las principales fuentes de este tipo de ficobiliproteínas, son las Espirulinas, pudiendo constituir hasta el 20 % de su peso en seco. Es soluble en agua y se puede extraer fácilmente como un complejo proteína-pigmento. El control del pH y el de la fuerza iónica durante dicha extracción junto con los procesos de separación y purificación son cruciales para la estabilidad de la ficocianina. La degradación de la ficocianina depende del estado de agregación de la proteína, que está influenciada por parámetros tales como la luz, la temperatura, el pH y la concentración de proteínas.

Entre las diversas aplicaciones que presenta esta proteína destacan las siguientes:

En diversos sectores industriales se utiliza como colorante tanto para alimentos como para cosméticos. Algunos ejemplos son la goma de mascar, los sorbetes de hielo, los refrescos, los dulces, la barra de labios y los delineadores de ojos.

Como trazadores bioquímicos en inmunoensayo debido a sus propiedades fluorescentes.

Se ha demostrado que tiene propiedades terapéuticas: esta proteína presenta capacidad anticancerígena, antioxidante y antiinflamatoria.

El uso de esta proteína en alimentos y otras aplicaciones es limitado debido a su sensibilidad al tratamiento térmico, lo que conlleva a la modificación de su color azul característico. La azida de sodio (NaN_3) y ditiotreitól ($C_4H_{10}O_2S_2$) son comúnmente utilizados como conservantes para el color de la ficocianina para fines analíticos, pero al ser tóxicos no se pueden utilizar en el ámbito alimenticio.

Por lo tanto, CORPOBIOMAR ha desarrollado su protocolo para extraer la Ficocianina de la Espirulina como un complejo proteína-pigmento, teniendo el control del pH y el de la fuerza iónica durante extracción junto con los procesos de separación y purificación cruciales para la estabilidad de la ficocianina. Nuestro proceso utiliza insumos para estabilizar las proteínas, y están siendo utilizados ampliamente en la actualidad en la industria alimentaria, así como en formulaciones farmacéuticas, y que son aptos para el consumo humano.

Proceso de obtención de Ficocianina

Extracción

Para el logro de extraer la mayor cantidad de Ficocianina, a la biomasa de Espirulina se requiere realizar varias etapas de extracción y en cantidades pequeñas de máximo 2 ml, debido a la necesidad de conservar la estabilidad de las moléculas.

Electroporación

La electroporación es una técnica que se utiliza para aumentar la permeabilidad de la membrana celular a iones y moléculas mediante pulsos cortos de altos campos eléctricos. Por esta técnica extraemos parte de la Ficocianina, logrando obtener el pigmento en cantidades pequeñas de la biomasa. Posteriormente, la biomasa es deshidratada para realizar el proceso con fluidos supercríticos por medio del cual se logra extraer el restante de Ficocianina.

Liofilización de la muestra

Con este proceso se retira la mayor cantidad de presencia de agua, restando tan solo el 2%, por medio de la sublimación, a presión reducida, de las partículas de hielo que anteriormente ya se han formado en el congelador. La decisión de agregar al proceso industrial de Ficocianina de la etapa de liofilización, es debido a que durante la deshidratación no ocurre ninguna desnaturalización del alimento y que a su vez permite la conservación de aproximadamente un 95% del valor nutricional que la biomasa posee, adicional a ello según las pruebas realizadas a nivel laboratorio y los resultados obtenidos, se confirma que, extraer el pigmento de una muestra sin contenido de humedad, es decir, con previa liofilización, favorece proporcionalmente. Para este procedimiento se toman 600 g de Espirulina que previamente debió estar congelada en una ultra-congelador Evermed a -76.5°C por 24 horas, asegurando la congelación completa de la materia prima. Seguidamente esta muestra se lleva a un liofilizador LABCONCO a una temperatura entre -86°C y -55°C , en las bandejas una temperatura constante de 25°C y a una presión de vacío de 0.2 mbar durante 31 horas.

Luego de que la muestra salga del proceso se tiene que almacenar en recipientes herméticos y a bajas temperaturas para evitar la desnaturalización.

Molienda

Se realiza un proceso de molienda posterior a la etapa de liofilización debido a que la biomasa al ser liofilizada queda totalmente seca y, por lo tanto, quedan en un estado sólido lo que hace más fácil la molienda.

Elección del solvente

Dentro de la gama de disolventes disponibles se encuentran categorizados por aquellos que son no polares y polares, para los que se encuentran en la segunda categoría se subdividen en polares apróticos y polares próticos, es decir, los apróticos se caracterizan por poseer un átomo de hidrogeno unido directamente a un átomo electronegativo y los apróticos por al contrario difieren de esta unión. Las Ficocianinas son compuestos netamente polares, es decir que para su correcta extracción es necesario el uso de un disolvente polar, más exactamente un polar prótico, debido a que en el momento en el que se encuentren en contacto en una mezcla los radicales libres de la estructura de la Ficocianina y el al átomo $-\text{OH}$, se unirán formando puentes de hidrogeno y permitiendo una correcta miscibilidad.

Extracción con fluidos supercríticos

Es una técnica que permite la separación de sustancias que están disueltas o incluidas dentro de una matriz, está basada en el uso de fluidos que se pueden llevar a un estado supercrítico, es decir a condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico, para modificar su

poder disolvente. Este fluido presenta propiedades intermedias entre un gas y un líquido, lo cual beneficia la penetración de este en la matriz y, por ende, la miscibilidad con el soluto, el fluido más usado en la industria corresponde al dióxido de carbono debido a sus condiciones críticas termodinámicas que facilitan la extracción de muchos compuestos termolábiles, la separación con el soluto es muy fácil, no posee problemas ambientales, además de no ser toxico.

Separación

Se realiza la separación por medio de centrifugado tres veces por cada 2 ml de muestra en cabina de flujo laminar.

Purificación

Cada sobrenadante resultado del proceso de centrifugación es filtrado por medio de filtro de 40 micras de tamaño de poro, seguido por filtro de 20 micras y finalmente se filtra con filtro de 0,22 micras.