

Tesina de Grado

Purificación y estudio de la estabilidad termodinámica de la proteína antena ficocianina



Lucía Minini Rivas

Tutor Eduardo Méndez
Co-tutora Beatriz Álvarez

Laboratorios de Biomateriales y Enzimología
Facultad de Ciencias, UdelaR
Octubre 2012

A Nicolás

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
1 INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Fotosíntesis y ficobilisomas	4
1.2 Biliproteínas	8
1.3 Ficocianina	12
1.3a Características generales	12
1.3b Aplicaciones en celdas solares y otros usos	14
1.4 Purificación	16
1.4a Precipitación	17
1.4b Cromatografía de intercambio iónico	19
1.4c Verificación de pureza	21
1.5 Estabilidad termodinámica.....	21
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo general	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1 Reactivos generales	26
3.2 Extracción	26
3.3 Precipitación con sulfato de amonio	26
3.4 Cromatografía de intercambio iónico	26
3.5 Análisis electroforético	27
3.6 Estudio de estabilidad	27
4 RESULTADOS.....	29
4.1 Proceso de purificación	29
4.1a Extracción	29
4.1b Precipitación con sulfato de amonio	30
4.1c Cromatografía de intercambio iónico.....	31
4.1d Verificación de la pureza	36
4.2 Estudio de estabilidad termodinámica.....	39

5 DISCUSIÓN	43
5.1 Purificación de ficocianina.....	43
5.2 Estudio de estabilidad termodinámica.....	45
6 CONCLUSIONES.....	48
7 REFERENCIAS	49
AGRADECIMIENTOS.....	52

RESUMEN

La ficocianina forma parte de un grupo de proteínas antena denominados biliproteínas, que participan en la fotosíntesis, y están presentes en cianobacterias y algas rojas. Estas biliproteínas forman parte de los ficobilisomas, complejos supramoleculares que forman arreglos regulares que se ensamblan en la membrana tilacoidal en células eucariotas y en procariontes en la membrana interna plasmática. La función principal que cumplen es transferir la energía lumínica absorbida por las biliproteínas que lo conforman hacia el centro de reacción embebido en la membrana fotosintética. Las biliproteínas pueden encontrarse a nivel de su estructura cuaternaria en equilibrio entre distintos conformeros: hexámeros, trímeros y monómeros. La función principal de estas biliproteínas es absorber energía lumínica donde la clorofila α absorbe pobremente. Para cumplir su función presentan cromóforos asociados que son los encargados de la absorción de la energía lumínica. La ficocianina es un pigmento accesorio fotosintético de color azul, forma parte del ficobilisoma y se encarga de transferir la energía lumínica absorbida a la aloficocianina. Absorbe energía a 621 nm y emite a 640 nm.

En este trabajo se purificó la ficocianina extraída de un extracto crudo acuoso de células de *Spirulina maxima* deshidratadas y se estudió la estabilidad termodinámica del producto extraído. Para ello, se siguió un procedimiento escalonado de purificación que involucró precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico y ultrafiltración. Se priorizó como criterio la selectividad de los procedimientos de purificación que condujeran a la separación de la ficocianina de la aloficocianina, empleando medidas de absorbancia selectivas para ello. El procedimiento global produjo un aumento en el índice de pureza de ficocianina en el extracto que se incrementó desde 0.69 hasta 2.04. Los geles de electroforesis en condiciones nativas y desnaturizantes demostraron la presencia de ficocianina.

Sobre la fracción aislada se llevaron a cabo estudios de estabilidad termodinámica, utilizando urea para inducir la desnaturalización. Mediante este estudio se pudo identificar parcialmente cuál fue el conformero de ficocianina aislado, en este caso se concluyó que la fracción aislada presentó predominantemente al trímero. Esta conclusión se basó en que en el perfil de desnaturalización sólo se observaron dos transiciones a 2.6 M y a 6.12 M, correspondientes al paso de trímero a monómero y de éste a las subunidades que lo conforman, respectivamente. También se obtuvieron a través de LEM (método de extrapolación lineal) los valores de energía de Gibbs de desnaturalización a concentración nula de agente (ΔG_{H_2O}). Éstos fueron de 17.15 kJ/mol para la primera transición y 10.19 kJ/mol para la segunda.

1 INTRODUCCIÓN

La ficocianina forma parte de las proteínas antena participantes en el proceso de fotosíntesis, conocidas como biliproteínas, presentes en cianobacterias y en ciertas algas rojas. Cumplen una función vital para los organismos que las albergan. En esta sección, se pretende describir las características de la ficocianina y su importancia en los organismos que están presentes, como también los distintos usos que se le da en la industria, y los procesos necesarios para su utilización en distintos rubros.

1.1 Fotosíntesis y ficobilisomas

La vida en la Tierra depende en gran medida del Sol. Uno de los eventos centrales para la evolución de la vida en la Tierra depende de él, la fotosíntesis oxigénica. Este proceso es llevado a cabo por variados organismos, incluyendo, cianobacterias, procariotas relacionados, y una amplia variedad de eucariotas, como algas y plantas superiores [1, 2]. En términos generales, la fotosíntesis oxigénica se basa en el secuestro químico de la energía solar, para luego fijar dióxido de carbono (CO_2) generando hidratos de carbono $(\text{CH}_2\text{O})_n$, acoplado a la liberación de oxígeno molecular (O_2).

Este proceso se lleva a cabo en dos etapas, (i) luminosa, donde la energía lumínica es usada para generar NADPH, ATP, y liberar O_2 (ii) oscura, independiente de la luz, donde el NADPH y ATP generados en la etapa luminosa, son usados para producir hidratos de carbono a través del CO_2 fijado [3].

Los procesos de la etapa luminosa en las células eucariotas se llevan a cabo en la membrana tilacoidal del cloroplasto, el organelo fotosintético. En células procariotas desprovistas de éstos, se realizan en la superficie de la membrana interna plasmática o en estructuras membranosas altamente invaginadas derivadas de ésta, conocidas como cromatóforos. La absorción de la energía lumínica es realizada principalmente por el pigmento clorofila, tetrapirrol cíclico relacionado al grupo hemo de las globinas, derivado fotosintético de la protoporfirina IX. La diferencia central entre ambas estructuras es la presencia de un átomo central Fe (II) en el grupo hemo mientras que en la clorofila el átomo central es de Mg (II). En la membrana fotosintética existen los centros de reacción, constituidos por moléculas de clorofilas especializadas, capaces de absorber energía lumínica de pigmentos antena y comenzar con el proceso fotosintético. Entre los pigmentos antena se encuentran moléculas de clorofila en eucariotas. En cianobacterias estos pigmentos antena son remplazados por biliproteínas que presentan como cromóforos a moléculas orgánicas derivadas de tetrapirroles lineales.

Para explicar cómo se da la obtención de NADPH, ATP y O₂ se utiliza el modelo del **esquema Z**, el cual postula que la producción fotosintética de O₂ ocurre a través de acciones en dos centros de reacción fotosintéticos que están conectados esencialmente en serie. Estos centros de reacción se encuentran en el fotosistema I y II. En el primero, se genera un reductor fuerte capaz de reducir el NADP⁺ y paralelamente un oxidante débil. En el fotosistema II se genera un oxidante fuerte capaz de oxidar una molécula de agua, conocido como **complejo evolutivo oxigénico**, complejo proteico transmembrana que presenta como cofactor Mn (II) y un reductor débil [4, 5]. Los componentes del esquema Z que median el transporte de electrones desde la molécula de H₂O al NADPH están organizados en tres complejos asociados a la membrana fotosintética, (i) fotosistema II, (ii) complejo de citocromo *b₆ f*, (iii) fotosistema I. Los electrones son transferidos entre estos complejos mediante transportadores de electrones móviles.

En la etapa oscura el NADPH y ATP generados en la etapa lumínica se usan para sintetizar hidratos de carbono y otras sustancias a través de CO₂ fijado. Esta producción se da mediante el Ciclo de Calvin, el cual se puede dividir en dos etapas, (i) el CO₂ fijado reacciona con ribulosa-5-fosfato para formar gliceraldehído-3-fosfato a expensas de ATP y de NADPH, el gliceraldehído-3-fosfato es usado para la biosíntesis de hidratos de carbono, aminoácidos y ácidos grasos; (ii) regeneración de la ribulosa-5-fosfato a través de cinco átomos de carbono remanentes de la formación del gliceraldehído-3-fosfato [3].

Las cianobacterias y algas rojas pueden presentar distintos colores, su apariencia está determinada por la contribución de distintos pigmentos como por ejemplo clorofila *a* y beta-caroteno, que se encuentran de forma invariable, y también otro tipo de proteínas denominadas biliproteínas, que se encuentran de forma variable entre distintas especies. Estas proteínas son las causantes de los distintos colores que pueden presentar dichos organismos, debido a que estas proteínas presentan distintos cromóforos asociados que determinan los distintos colores que pueden presentar [6]. Además de brindar esta variación en la apariencia del organismo que las contenga, son muy abundantes en la célula, ya que representan el cincuenta por ciento de las proteínas solubles [7]. En el contexto celular se encuentran organizadas en complejos supramoleculares conocidos como ficobilisomas (fig.1), los cuales forman arreglos regulares que se ensamblan a la membrana tilacoidal, en células eucariotas, mientras que en procariotas se ensamblan al interior de la membrana plasmática o a estructuras superiores invaginadas derivadas de la membrana interna llamadas cromatóforos [3, 8].

Debido a la función fundamental que estos complejos cumplen en la fotosíntesis, se localizan en ciertas regiones de la membrana fotosintética donde se asocian de forma estrecha con el centro de reacción, el cual se encuentra embebido en la membrana [7].

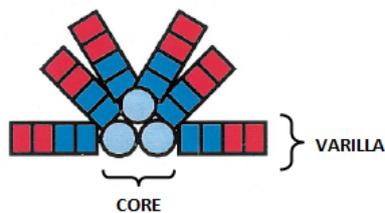


Figura 1. Estructura del ficobilisoma. Consiste en dos dominios morfológicamente distintos, CORE (celeste) formado por un único tipo de biliproteína, conocida como aloficocianina, mientras que la varilla está constituida por dos tipos de biliproteínas, en la región más externa de la varilla (rojo) se denomina ficoeritrina, mientras que la más interna es la ficocianina (azul). Adaptada de referencia 7.

Los ficobilisomas están compuestos por dos dominios estructurales, uno está organizado en forma de triángulo equilátero conformado por tres cilindros de pigmento, el cual se denomina CORE. El segundo dominio está compuesto por seis estructuras de pigmento periféricas en forma de varilla que emanan desde el CORE (fig. 1) [9]. Comúnmente las varillas presentan dos biliproteínas, la ficocianina, más cercana al CORE y la ficoeritrina en la periferia de la varilla, mientras que el CORE está compuesto principalmente por hexámeros de aloficocianina. Además de las biliproteínas que se organizan en estos dominios, existen otros polipéptidos no pigmentados denominados péptidos de anclaje, que constituyen un 15 % del ficobilisoma y se asocian fuertemente a los hexámeros de las biliproteínas.

La función principal del ficobilisoma es transferir la energía lumínica absorbida por las biliproteínas hacia el centro de reacción embebido en la membrana fotosintética, el cual presenta clorofila *a*, pigmento central en el proceso de fotosíntesis. Para estudiar cómo se da la transferencia de energía dentro del ficobilisoma es necesario conocer el tipo de funciones de ensamblaje entre las biliproteínas. No todas estas funciones son capaces de transferir energía sino que dependen de la distancia entre los cromóforos de las biliproteínas ensambladas y de su orientación en ambas biliproteínas. En los ficobilisomas se dan cinco tipos de funciones de ensamblaje, (i) “*posterior-posterior*”, entre la ficoeritrina y ficocianina (ii) “*lado-lado paralelo*” entre ficoeritrina y ficocianina, (iii) “*lado-posterior*” entre ficocianina y aloficocianina, (iv) “*lado-lado perpendicular*” de primer tipo y (v) de segundo tipo entre ficocianina y aloficocianina (fig. 2).

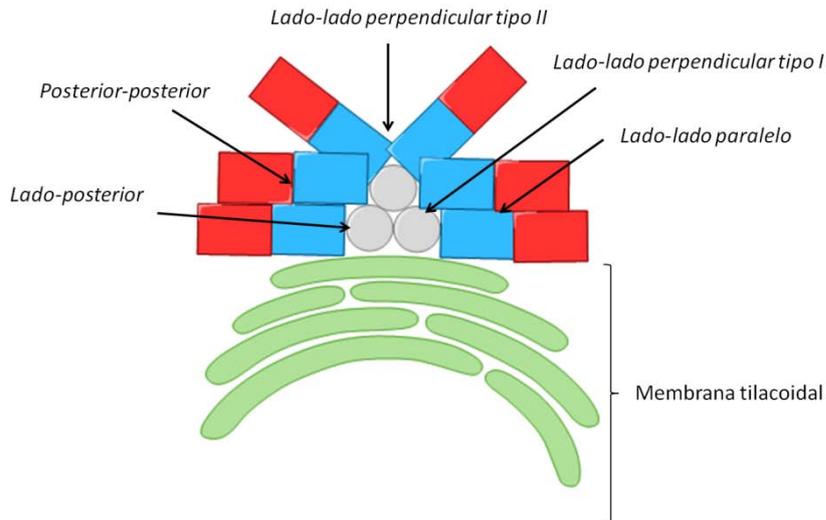


Figura 2. Funciones de ensamblaje entre las distintas biliproteínas en el ficobilisoma.

La transferencia de energía entre la ficocianina y la ficoeritrina se puede dar entre las funciones de ensamblaje (i) y (ii). La función de ensamblaje (i) presenta distancias cortas para que se dé la transferencia pero las orientaciones de los cromóforos no son adecuadas, por tanto la función (ii) es la adecuada para la transferencia de energía. Mientras que entre la ficocianina y la aloficocianina se da por funciones (iii) y (iv), mientras que las función v no favorece la transferencia de energía [10].

Se cree que la función de los péptidos de anclaje es participar en el ensamblaje y estabilización de los hexámeros de las biliproteínas [7], como también generar cambios en el espectro de las biliproteínas, para de esta manera direccionar la migración de la energía de forma más eficiente dentro del ficobilisoma [9]. En el CORE además de la aloficocianina se encuentra el péptido de anclaje "Lcm" que se encarga de estabilizar la estructura del CORE mientras que los péptidos α^{APB} y $\beta^{18.3}$ son los aceptores finales de energía del ficobilisoma y por tanto los encargados de pasar la misma a la clorofila a en el centro de reacción [7].

Teniendo en cuenta el orden de las biliproteínas en el ficobilisoma (figs. 1 y 2) y las longitudes de onda máximas de absorción (λ_{max}) de cada una (tabla 1), se puede concluir que su organización en el ficobilisoma corresponde con el flujo de excitación de la energía espontáneo, o sea, de transiciones de mayor energía (ficoeritrina) a transiciones de menor energía (aloficocianina) [6].

Tabla 1. Distintas bilinas asociadas a cada biliproteína, posición en la que se encuentran en la cadena polipeptídica y longitud de onda máxima de absorción para cada biliproteína.

Biliproteína	Bilina y posición	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Ficocianina	$\alpha 84$, $\beta 84$ y $\beta 155$ /PCB	620
Aloficocianina	$\alpha 84$, $\beta 84$ /PCB	650
Ficoeritrocianina	$\alpha 84$ /PVB, $\beta 84$ y $\beta 155$ /PCB	575
Ficoeritrina	$\alpha 84$, $\alpha 140$, $\beta 50/61$, $\beta 84$ y $\beta 155$ /PEB	565

1.2 Biliproteínas

Las biliproteínas presentes en cianobacterias y algas rojas se obtienen como producto de disociación de los ficobilisoma. Cuando las células de estos organismos se lisan, los componentes celulares escapan al medio acuoso y los ficobilisomas se disocian en sus componentes, las biliproteínas se pueden encontrar libres o en asociación a los péptidos de anclaje [9]. Sus propiedades espectroscópicas presentan como particularidad, una buena absorción en la región visible del espectro, enormes coeficientes de extinción molar, buena emisión de fluorescencia, grandes corrimientos de Stokes y muy poco *quenching* entre los cromóforos de la biliproteína [11].

Estas proteínas pueden encontrarse, a nivel de su estructura cuaternaria, en equilibrio entre distintos confórmeros. Se pueden encontrar como una estructura en forma de disco, conocida como hexámero ($\alpha_6\beta_6$). Éstos están formados por una interacción “cara contra cara” de dos heterodímeros, denominados trímeros ($\alpha_3\beta_3$). Los hexámeros se encuentran en equilibrio con dichos trímeros, los cuales se disocian en heterodímeros ($\alpha\beta$), conocidos como monómeros. Por último estos monómeros se disocian en las subunidades que los conforman, una alfa (α) y otra beta (β) (fig. 3) [10, 12]. Estas subunidades presentan distinto peso molecular, como también distinta cantidad de cromóforos unidos, dependiendo del tipo de bilina, esto puede observarse claramente en la tabla 1.

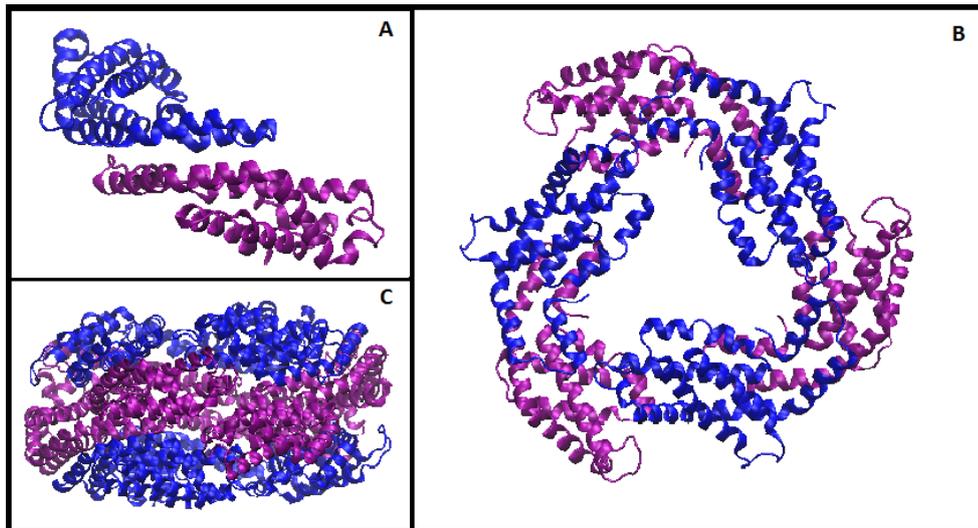


Figura 3. Estructura tridimensional de la ficocianina. En A se muestra el monómero conformado por las subunidades α y β . En B se muestra el trímero conformado por tres monómeros y en C se muestra el hexámero conformado por dos trímeros. Imagen generada con el programa VMD a partir del archivo con código PDB 1GH0.

La función principal de las biliproteínas en la fotosíntesis es absorber energía lumínica en regiones donde la clorofila a , pigmento central de este proceso, absorbe pobremente. Estas proteínas también permiten que la energía migre eficientemente desde un punto dado al centro de reacción. Para una complementación eficiente de la absorción de dicha energía, es importante que las biliproteínas absorban fotones de un rango amplio de energía [9]. Para cumplir esta función vital, presentan cromóforos asociados que son los encargados de la absorción de la energía lumínica y también de los colores característicos que presentan. Estos cromóforos son tetrapirroles de cadena abierta y se unen de forma covalente a las apoproteínas como grupos prostéticos, conocidos como bilinas. Las bilinas unidas a las apoproteínas son ficocianobilinas (PCB) de color azul, ficoeritrinbilinas (PEB) de color rojo, ficourobilina (PUB) de color amarillo, y ficobilviolina (PXB) de color púrpura (fig. 4) [7, 8].

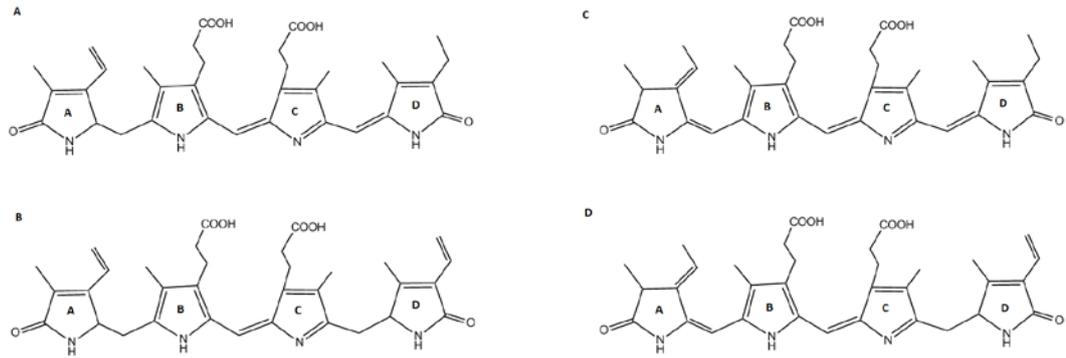
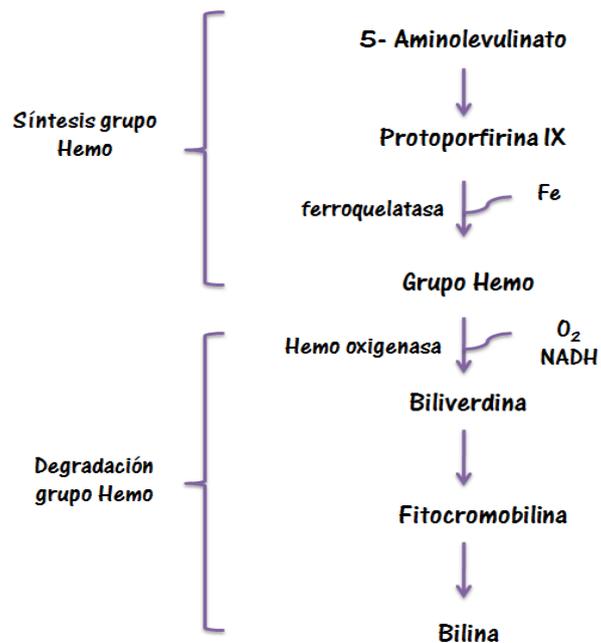


Figura 4. Estructura de las distintas bilinas asociadas a las apoproteínas. En A se observa ficobiliviolina, en B ficourobilina, en C ficcianobilina y en D ficoeritrinbilina.

Las bilinas se sintetizan a través de la reducción de biliverdina, formada por la síntesis y posterior degradación del grupo hemo (esquema 1). El grupo hemo se sintetiza de igual forma en animales, algas rojas y cianobacterias, por tanto las bilinas se sintetizan por un mecanismo similar. La diferencia principal entre las bilinas en animales y cianobacterias, se debe a que en cianobacterias cumplen funciones vitales para el metabolismo energético del organismo mientras que en animales su producción se debe a la correcta eliminación del grupo hemo del organismo [7, 13].



Esquema 1. Síntesis de bilinas en algas rojas y cianobacterias.

Las bilinas se unen a la cadena polipeptídica de la apoproteína a través de un enlace tioéter, entre un sustituyente vinílico de uno, dos o ambos anillos tetrapirrólicos A y D, y una, dos o más cisteínas conservadas. Estas posiciones conservadas son, para la cadena α , 84 y 143; y para la cadena β , 50, 61, 84 y 155 (fig 5) [8]. En la naturaleza se encuentran distintas biliproteínas con una o más bilinas asociadas a dichas posiciones conservadas, en la tabla 1 pueden observarse las distintas biliproteínas con el tipo de bilina que presentan y en qué posición.

Como puede observarse en la figura 4, las bilinas son isómeros entre sí, pero presentan valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ distintos. Cuando estos cromóforos se encuentran unidos a las apoproteínas, los valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ para PUB, PXB, PEB y PCB son aproximadamente 498, 568, 535-567 y 590-670 nm, respectivamente. El valor de absorción máxima para cada bilina se encuentra fuertemente influenciado por su conformación y por las interacciones entre ésta y los residuos aminoacídicos de la apoproteína en la conformación que se encuentran. La conformación de la apoproteína a su vez se ve considerablemente afectada por el estado de agregación en el que se encuentran, por tanto dependiendo del tipo de conformero en el cual se encuentre la misma, el máximo de absorción cambia [7].

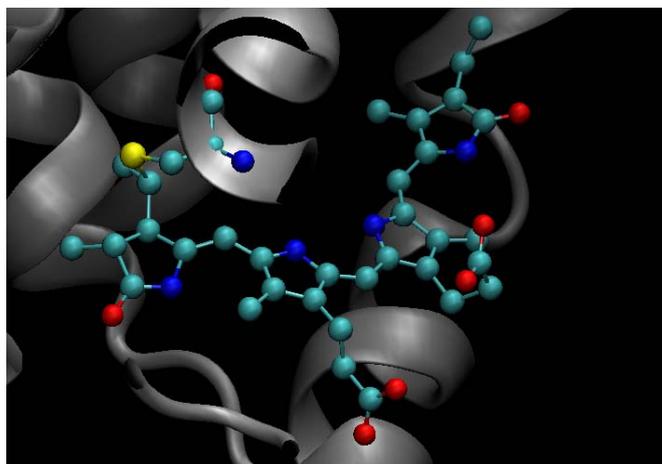


Figura 5. Unión covalente a través del enlace tioéter entre la Cys84 de la apoproteína y la ficocianobilina, con el código PDB 1GH0 para la ficocianina. La apoproteína se representa con su estructura secundaria con color gris y la bilina mediante bolas y varillas, los colores representan el tipo de átomo, amarillo azufre, azul nitrógeno, rojo oxígeno, celeste carbono, los hidrógenos no están representados. Imagen obtenida mediante el programa VMD.

La ficocianina y la aloficocianina presentan el mismo tipo de bilina (tabla 1), pero ambas tienen distintos $\lambda_{m\acute{a}x}$, debido a que el espectro de absorción y sus absorptividades dependen de distintos factores. Estos factores se clasifican en seis categorías; (i) la apoproteína causa que la bilina se mantenga en una conformación extendida, lo cual maximiza la absorción en la región visible del espectro, sin la influencia de la apoproteína

la bilina tiende a ser más cíclica, lo que baja la absorción en la región visible; (ii) la unión de la bilina a una o dos Cys conservadas a través del enlace tioéter; (iii) la interacción entre dos o más bilinas vecinas; (iv) la agregación de las biliproteínas en monómeros, trímeros y hexámeros también genera diferencias en la absorción de las bilinas; (v) el ambiente local de las bilinas es otro factor de cambio en la absorción; (vi) la asociación a péptidos de anclaje causa modificaciones en la absorción de las biliproteínas [6, 7, 9, 14, 15].

1.3 Ficocianina

1.3a Características generales

La ficocianina es un pigmento accesorio fotosintético de color azul, forma parte del ficobilisoma y en la fotosíntesis se encarga de transferir la energía lumínica a la aloficocianina. Absorbe energía a aproximadamente 620 nm y emite a 640 nm. Es la biliproteína más abundante y se encuentra en todas las cianobacterias conocidas [16]. Esta biliproteína posee tres ficocianobilinas por monómero, una en la cadena α y dos en la β con posiciones de unión reportadas en la tabla 1. Aunque las tres bilinas son iguales, sus propiedades espectroscópicas cambian debido a que presentan diferentes interacciones electrostáticas con los residuos proteicos que las rodean. La bilina β 155 es clasificada como un cromóforo de alta energía con un $\lambda_{\text{máx}} = 596\text{-}600$ nm, α 84 es clasificado como un cromóforo intermedio con un $\lambda_{\text{máx}} = 618\text{-}624$ nm y β 84 con un $\lambda_{\text{máx}} = 622\text{-}628$ nm es el cromóforo de menor energía. Los cromóforos α 84 y β 155 absorben luz en la región amarilla del espectro y transfieren la energía absorbida al cromóforo β 84 de forma no-radiativa. En el ficobilisoma estos cromóforos se organizan de forma tal que α 84 y β 155 le transfieren la energía al cromóforo β 84 [17].

Esta proteína, al igual que las demás biliproteínas, puede presentarse como distintos conformeros, monómeros, trímeros y hexámeros. En solución estos se encuentran en equilibrio. Se ha observado que modificando las condiciones de la solución se puede favorecer el equilibrio para uno u otra conformación de la ficocianina. El hexámero se ve favorecido por altas concentraciones salinas, bajo pH (5 a 6) y concentraciones de ficocianina mayores a 1 mg/ml, mientras que el trímero predomina al disminuir la concentración salina, aumentar el pH (mayores a 7) y a concentraciones de ficocianina menores 1 mg/ml. Con respecto a la presencia del monómero se requieren condiciones neutras [12, 18-20]. Los conformeros nativos presentan leves diferencias en sus $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción así como en sus coeficientes de absorción molar (ϵ_M) (tabla 2) [18, 20].

Tabla 2. Longitudes máximas de absorción y coeficientes de absorptividad molar para cada confórmero de ficocianina

Confórmero	λ_{\max} (nm)	ϵ_M ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
Hexámero ^a $[(\alpha\beta)_3]_2$	621 ^a	333000 ^a
Trímero $(\alpha\beta)_3$	616-618	97300
Monómero $(\alpha\beta)$	611-613	90700
Subunidad α	619	117300
Subunidad β	604-605	97300
Sub- α desnaturalizada	602-599	16100
Sub- β desnaturalizada	608-609	11300

^a Datos obtenidos de referencia 18 en amortiguador acetato 0.2 M a pH 5.5. El resto de los valores se obtuvieron de la referencia 16, en amortiguador fosfato 50 mM a pH 7.

Para utilizarla en distintos rubros, es necesaria su purificación a partir de distintos organismos que las albergan. La realización de su purificación requiere conocer ciertas características, para de esta manera seguir el proceso de purificación y poder identificar que se está purificando. Una de estas características es conocer el peso molecular de la proteína, en el caso de la ficocianina conociendo el peso molecular de las subunidades que la conforman se puede conocer el peso de todos los confórmeros que se pueden formar. Mediante la secuencia primaria polipeptídica de ambas cadenas, α y β es posible obtener su peso molecular. Para esto se utilizó el servidor EXPASY [21]. Los pesos obtenidos fueron de 17.59 kDa y 18.06 kDa para las cadenas α y β , respectivamente. La obtención del peso total de la subunidad proteica se obtiene sumando el peso de la apoproteína y el de la cantidad de bilinas que tiene asociada. En este caso se obtuvo un peso de 18.17 kDa y 19.24 kDa para la subunidad α y β , respectivamente [22]. Estos valores coinciden con aquellos encontrados en la bibliografía para la subunidad α entre 17-20 kDa y la subunidad β entre 20-24 kDa [23-25]. Otra característica muy importante para la purificación de proteínas es conocer su punto isoeléctrico, mediante el mismo se pueden aplicar técnicas dependientes del pH, o de la carga neta de la proteína para la purificación. En este caso la ficocianina presenta un punto isoeléctrico de 5.2, por tanto en solución a pH neutro presenta carga negativa [26].

Para cuantificar la cantidad de ficocianina en una solución se sigue su absorbancia a 621 nm, como se mostró anteriormente presenta altos coeficientes de absorción a dicha longitud de onda. Cuando en la solución también está presente la aloficocianina, la concentración de ficocianina, en mg/ml, puede obtenerse a través de la ecuación 1, donde A_{621} representa la absorbancia de la ficocianina y A_{652} la absorbancia de la aloficocianina, los demás son factores obtenidas mediante los coeficientes de absorptividad de cada proteína [27, 28].

$$[PC] = \frac{A_{621} - (0.474 A_{652})}{5.34} \quad \text{Ec.1}$$

1.3b Aplicaciones en celdas solares y otros usos

La ficocianina es de gran interés en distintas áreas como en la industria farmacéutica, cosmética, alimenticia y energética [8, 17, 29].

En determinados países como Japón es utilizada como colorante de comidas, ya sea bebidas, goma de mascar, helados, caramelos, bebidas alcohólicas y decoraciones para tortas entre otras. También es empleada en el área cosmética para lápices labiales y delineadores para los ojos [30].

Últimamente se ha observado un creciente interés en el posible uso de la ficocianina para tratar distintas patologías. Debido a que se han realizados pruebas *in vitro* e *in vivo* que demuestran actividad como antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral, antiartrítico y como captor de radicales libres, se ha propuesto que podría presentar propiedades hepatoprotectivas e inhibir la peroxidación lipídica [31-33].

En el área tecnológica se ha propuesto como sensibilizador de celdas solares sensibilizadas con pigmentos (DSSCs). Las celdas DSSCs se basan en el principio primario de la conversión de energía en la fotosíntesis, por tanto se encargan de la transformación de energía lumínica en electricidad. Estas celdas típicamente están formadas por una película de material semiconductor, mesoporoso y nanoestructurado, en general dióxido de titanio (TiO_2). El semiconductor funciona como ánodo, y la película que forma está recubierta con moléculas de pigmento, sensibilizadores de la celda. Usualmente se utilizan sensibilizadores que presentan metales de transición coordinados como el rutenio. A su vez, el semiconductor se deposita sobre un óxido transparente conductor (electrodo de TCO o de ITO), a través del cual se ilumina la celda. Por último, todo el ensamblado se pone en contacto con una solución conteniendo al par redox yoduro/trioduro (I/I_3^-) que actúa como conductor y que está eléctricamente conectado con un contra-electrodo, principalmente de platino, que funciona como cátodo, el cual cierra el circuito (fig. 6) [34-37].

La síntesis de pigmentos que presentan metales de transición coordinados es muy compleja y cara, además de que estos metales representan un recurso no renovable. Por dicha razón últimamente se ha propuesto el uso de pigmentos naturales. Éstos presentan ciertas desventajas, la respuesta fotovoltaica es pobre debido a que la energía de unión con el material mesoporoso es baja y pobre absorción de carga en todo el espectro visible [35]. A su vez, presentan muchas ventajas, (i) son más baratos y fáciles de obtener con respecto a los complejos de rutenio usados, (ii) presentan grandes coeficientes de absorción molar debidos a las transiciones $\delta - \delta^*$ intramoleculares y (iii) no son un recurso limitado, ya que no presentan en su estructura metales nobles. Además el uso de

estos pigmentos naturales no tóxicos pueden potenciar los beneficios ambientales y económicos como alternativa para la conversión de energía solar.

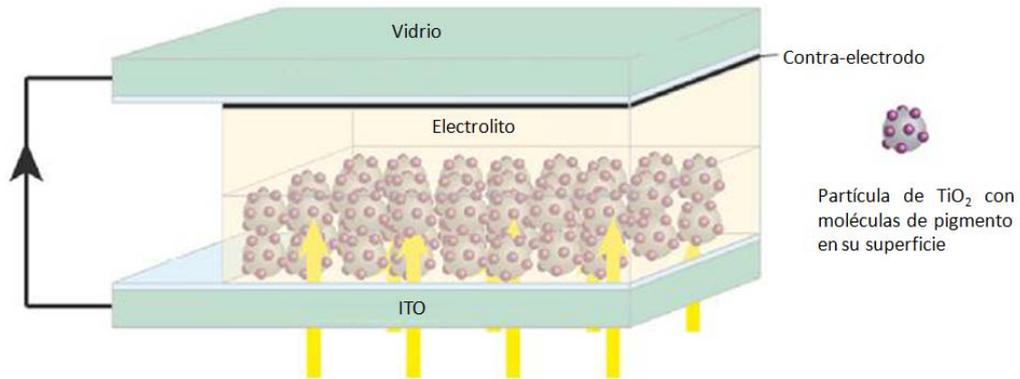


Figura 6. Composición de las celdas de tipo DSSCs, en la imagen se puede observar por donde pasa la luz solar y en qué sentido se mueve la electricidad [36].

La ficocianina es elegida debido a la absorción de luz visible y la presencia de dos grupos carboxilo libres ($-\text{COOH}$) en la ficocianobilina, lo que posibilita la unión de la ficocianina con la superficie del semiconductor de TiO_2 . Este grupo químico se une al titanio por medio de una quimisorción, formándose un complejo. Existen dos tipos de reacciones de condensación posibles por los cuales la ficocianobilina forma enlace con el dióxido de titanio, mediante una interacción entre el grupo OH^- y el Ti o mediante una interacción entre dos grupos OH^- y el TiO_2 (fig. 7) [38]. Esta unión permite la transferencia electrónica desde la ficocianina a la banda de conducción del dióxido de titanio [39]. Otra razón por la cual es una buena opción para estas celdas es por la presencia de muchos cromóforos de tipo bilina con grandes coeficientes de absorptividad molar, su estabilidad en solución y en fase sólida [8].

Para utilizar la ficocianina en las áreas propuestas, se han determinado ciertos índices de pureza, según el área donde se quiera usar. Estos índices de pureza están determinados por el cociente entre la absorbancia a 621 nm (correspondiente a la ficocianina) y a 280 nm (correspondiente a contaminantes proteicos en la muestra). Un índice igual a 0.7 es considerado de grado alimentario, uno igual a 3.9 grado de reactivo y valores mayores a 4.0 grado analítico [27, 40, 41].

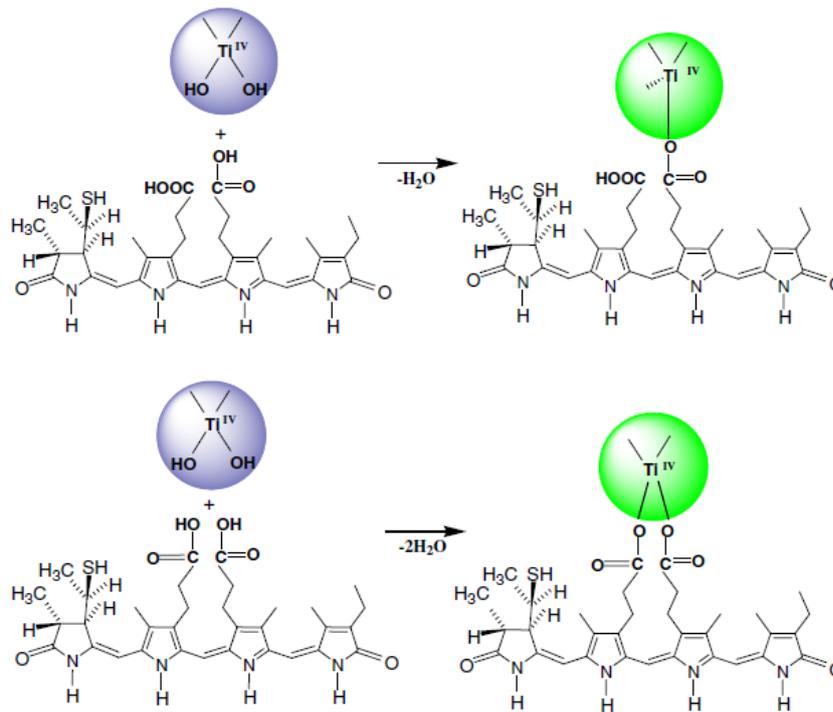


Figura 7. Unión entre el titanio y la ficocianobilina. Adaptado de referencia 6.

1.4 Purificación

Para utilizar a la ficocianina en las áreas antes mencionadas, es necesaria su purificación, para de esta manera quitar los contaminantes que puedan interferir en su función. Los contaminantes más importantes cuando se quiere purificar ficocianina son las demás bilinas. En el caso de estudio el contaminante principal es la aloficocianina, la *Spirulina maxima* no presenta ficoeritrina en el ficobilisoma. La aloficocianina es contaminante debido a que presenta una estructura similar a la ficocianina como también el mismo tipo de bilina. Sin embargo, no presenta iguales propiedades espectroscópicas.

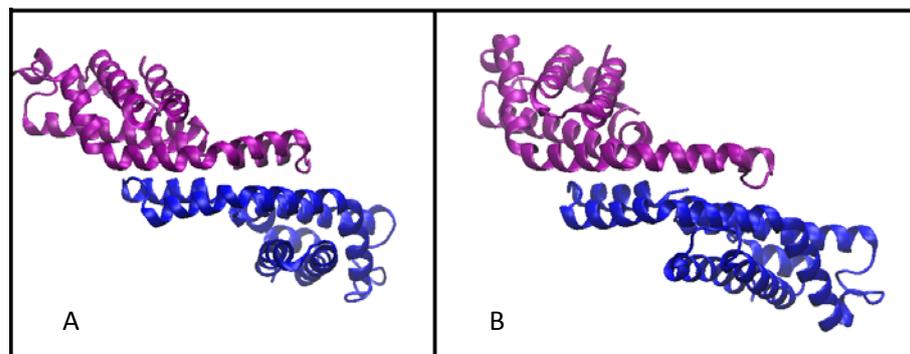


Figura 8. Estructura del monómero de aloficocianina (A) y de ficocianina (B). Imagen obtenida con el programa VMD usando los códigos PDB 1KN1 y 1GH0, respectivamente.

Las proteínas son purificadas a través de métodos de fraccionamiento, en una serie de pasos independientes donde las propiedades fisicoquímicas de las proteínas son utilizadas para separar progresivamente a la proteína de interés de otras sustancias. Cuando se realiza la purificación de una proteína se pretende eliminar selectivamente los contaminantes de la mezcla, para que de esta manera sólo la sustancia de interés prevalezca, como también minimizar la pérdida de la proteína de interés. Las propiedades fisicoquímicas utilizadas para los procesos de purificación son solubilidad, carga iónica, peso molecular, pH y unión específica a otras moléculas biológicas. En la tabla 3 se muestran los distintos métodos de fraccionamiento conocidos relacionados con las propiedades en las que se basan [3].

Tabla 3. Relación entre las propiedades fisicoquímicas y los métodos de fraccionamiento que se pueden seguir para la purificación.

Propiedad fisicoquímica	Método de fraccionamiento
Solubilidad	Salting in Salting out
Carga iónica	Cromatografía de intercambio iónico Electroforesis
Polaridad	Cromatografía de adsorción Cromatografía de papel Cromatografía de fase-reversa Cromatografía de interacción hidrofóbica
Peso molecular	Diálisis y ultrafiltración Electroforesis en gel Cromatografía de gel filtración Ultracentrifugación
Unión específica	Cromatografía de afinidad

En esta sección se detallarán las técnicas de purificación de proteínas realizadas en este trabajo, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, diálisis, electroforesis y ultrafiltración.

1.4a Precipitación

Para realizar la purificación de proteínas a partir de un extracto celular, el primer paso en el proceso de purificación suele ser un paso de *precipitación*. Este paso se basa en

alterar las condiciones del solvente, por ejemplo variando la concentración salina del medio. De esta manera, conociendo las características de la proteína de interés, puede ser aislada parcial o totalmente del extracto. Una de las características más importantes de este método, y por lo cual es muy utilizado para realizar fraccionamiento de proteínas en una solución, es que las proteínas presentan típicamente un rango de concentración salina a la cual precipitan [40, 42].

Suele usarse la precipitación con sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Su popularidad se debe a que presenta características favorables para este proceso, como alta solubilidad y bajo costo. Por otra parte es capaz de estabilizar la estructura proteica y de generar una densidad menor de la solución saturada que la de otro tipo de agentes precipitantes. Además es un método aplicable a grandes escalas ya que requiere de un equipamiento simple y de bajo costo. Por último la proteína aislada obtenida a través de este método en general conserva su actividad biológica y es simple diluir la sal del medio [40, 42].

El tipo de precipitación que se lleva a cabo con el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es a alta concentración salina, proceso conocido como *“salting out”*. En la figura 9 se observa la curva de solubilidad de una proteína tipo, donde se grafica el logaritmo de la solubilidad en función de la concentración de un agente precipitante, en este caso el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Dicha curva presenta dos regiones bien diferenciadas, una región denominada *“salting in”* donde la solubilidad aumenta al aumentar la concentración salina y otra región conocida como *“salting out”* donde la solubilidad de la proteína disminuye al aumentar la concentración salina [42].

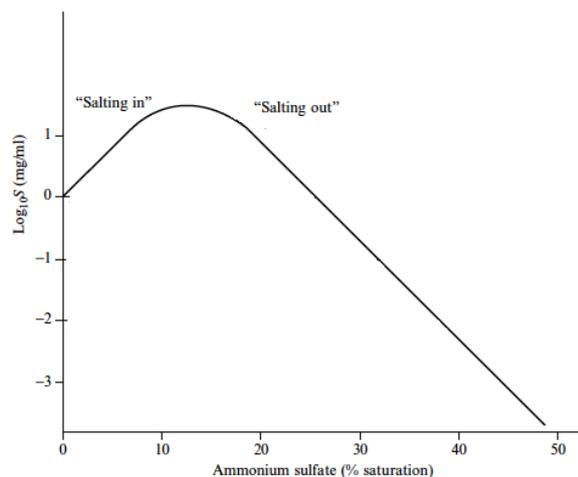


Figura 9. Curva de solubilidad para una proteína tipo. Se observan dos regiones bien diferenciadas, como *“Salting in”* y *“Salting out”* [20].

El proceso “*salting out*” es dependiente de la hidrofobicidad de la proteína en cuestión. Este proceso se debe a una competencia entre la proteína y los iones salinos introducidos por las moléculas de agua. Por tanto, la sal introducida en la solución es solvatada por las moléculas de agua, que anteriormente interaccionaban con las proteínas en solución. Al perder la solvatación por las moléculas de agua las interacciones proteína-proteína aumentan y las interacciones proteína-moléculas de agua disminuyen. Este cambio en las interacciones predominantes genera que las proteínas se agreguen unas con otras a través de las regiones hidrofóbicas que presentan, lo que genera su posterior precipitación, debido a que las interacciones con el solvente se hacen mínimas [40, 43].

Luego de realizar la precipitación de la proteína de interés, puede ser necesario reducir la alta concentración salina que presenta dicha solución, para seguir con la purificación y usarla en otro tipo de técnicas donde la alta concentración salina pueda interferir. Una de las técnicas más populares para quitar altas concentraciones salinas del medio, es el proceso de **diálisis**. Se basa en un método de separación de moléculas en solución, dependiente del tamaño, mediante difusión selectiva a través de una membrana semipermeable. Esta técnica es muy usada para separar solutos de bajo peso molecular, como las sales, de solutos de grandes peso molecular, como las proteínas. Para que el soluto de bajo peso molecular sea eliminado de la solución es necesario que el volumen de la solución amortiguadora (*dializado*) sea varios órdenes de magnitud mayor al de la solución de interés [44].

Otro método usado comúnmente para la purificación de proteínas es la **ultrafiltración**, que ha suplantado en gran medida a la diálisis. Se basa en el pasaje forzado de una solución a través de una membrana semipermeable, bajo presión o centrifugación. La membrana semipermeable puede estar compuesta por acetato de celulosa, nylon, etc. El solvente y pequeños solutos son capaces de pasar a través de la membrana, permitiendo de esta forma concentrar la solución macromolecular. Por tanto este método puede usarse para desalar una solución macromolecular, y también puede ser usada para separar macromoléculas de distinto peso molecular [3].

1.4b Cromatografía de intercambio iónico

En los procesos cromatográficos se disuelve una mezcla a ser fraccionada en una fase líquida o gaseosa conocida como *fase móvil*. La mezcla disuelta se aplica a una columna que consiste en una matriz porosa, conocida como *fase estacionaria*. Las interacciones individuales entre cada componente de la mezcla con la fase estacionaria y los distintos tipos de fuerzas que retardan el recorrido, causan que cada uno de los componentes tenga una tasa de migración determinada, promoviendo su separación. Esto genera que en la columna se formen bandas estrechas correspondientes a cada componente. Los distintos métodos cromatográficos pueden ser clasificados según la naturaleza de la fase móvil y de

la fase estacionaria. También se clasifican según las interacciones existentes entre la fase móvil y las sustancias que van a ser separadas. Por ejemplo, si la fuerza que regula la tasa de migración es de carácter iónico, la técnica de separación es la ***cromatografía de intercambio iónico*** [3].

La cromatografía de intercambio iónico es un método cromatográfico muy usado para la separación y purificación de proteínas. Es una herramienta versátil y genérica, siendo usada para aislar nuevas proteínas, purificación de alta resolución y producción industrial [45]. La separación y purificación es realizada en condiciones suaves, lo que permite que las proteínas mantengan su conformación nativa, constituyendo una gran ventaja respecto a otro tipo de métodos [41]. Este proceso se basa en el intercambio de iones entre una matriz insoluble (fase estacionaria) y los iones en la fase móvil, los iones presentes en la fase móvil se unen a través de fuerzas electrostáticas a la matriz insoluble de forma reversible. Cuando se adiciona la mezcla a ser separada, los iones unidos a la matriz pueden ser reemplazados por componentes de la mezcla que presenten mayor afinidad de unión con la matriz, como por ejemplo, proteínas que presentan una carga neta adecuada para su unión. Las matrices insolubles son conocidas como intercambiadores iónicos, capaces de intercambiar iones. Existen dos tipos de intercambiadores, los aniónicos que se encuentran cargados positivamente y son capaces de intercambiar aniones y los intercambiadores catiónicos capaces de intercambiar cationes, que se encuentran cargados negativamente. La afinidad con que se une la proteína cargada al intercambiador depende de la naturaleza y concentración de los demás iones en la solución. Esto se debe a que los mismos compiten por los sitios de unión del intercambiador. La afinidad de la proteína también depende de la presencia de grupos con características ácido-base en su estructura, los cuales son altamente dependientes del pH de la solución ya que al variarlo, la carga neta de las proteínas también varía. Por tanto, para obtener un pegado óptimo de la proteína de interés, es necesario conocer la concentración salina y el pH al cual la proteína se une al intercambiador [3].

Cuando se tiene una solución proteica impura, los componentes de esta solución se unen con distinta afinidad al intercambiador. Por tanto, al realizar la elución de la columna cada proteína saldrá de la misma en una fracción determinada, dependiendo de la afinidad de cada una por la matriz. En los primeros lavados con solución amortiguadora de carga, eluyen aquellas proteínas con menor afinidad por la matriz. Para la elución de aquellas proteínas que presentan alta afinidad por la matriz, es necesario cambiar las propiedades de la solución amortiguadora, ya sea pH o concentración salina. Ambos cambios generan que las interacciones entre la matriz y la proteína se debiliten, permitiendo que la misma eluya de la columna. Para saber en qué fracción del proceso de elución se obtiene la proteína de interés, se pueden seguir distintas propiedades, como por ejemplo la absorbancia característica de la misma [3].

1.4c Verificación de pureza

Para verificar el proceso de purificación, se pueden realizar distintos métodos, comúnmente se realiza la técnica conocida como **electroforesis**. Esta técnica se basa en la migración de iones en un campo eléctrico, en este sentido es usada para la separación de moléculas biológicas. Dentro de los distintos tipos de electroforesis, la electroforesis en gel es uno de los métodos más usados para la separación de macromoléculas en presencia de un campo eléctrico. La separación molecular se basa en la filtración de las moléculas a separar a través de los poros presentes en el gel, los cuales pueden estar formados por poli(acrilamida) o agarosa, estos se diferencian en el tamaño del poro, los geles de poli(acrilamida) presentan poros más pequeños que aquellos de agarosa, como también por las movilidades electroforéticas de las moléculas a ser separadas. Estos geles generan el retardo de moléculas grandes, en relación a las más pequeñas, debido a que las moléculas no pueden salir del gel, lo que genera que el movimiento electroforético de las moléculas grandes se vea impedido. Las bandas obtenidas a través de la separación electroforética pueden ser localizadas mediante distintas técnicas. Para las proteínas se usa preferentemente el teñido del gel con la solución azul de Coomassie brillante. El teñido de las bandas se lleva a cabo introduciendo al gel en una solución ácida-alcohólica que presenta el pigmento, de esta forma el mismo se fija en la proteínas del gel [3].

Existen distintos tipos de electroforesis, entre éstas las más usadas para la verificación del proceso de purificación son la electroforesis nativa y la electroforesis desnaturizante. La electroforesis nativa, como lo dice su nombre, es realizada en condiciones nativas, por tanto las moléculas biológicas que se encuentren en la muestra migran por su forma, carga y peso. Debido a las propiedades de migración a través de este tipo de electroforesis es posible diferenciar si se encuentran distintos conformeros en la muestra, pero no es posible identificar el peso molecular de éstos por lo que no es posible la identificación del material purificado, para esto se realiza la electroforesis desnaturizante. En este tipo de electroforesis las moléculas migran sólo por su peso y no por su forma o carga, se agrega el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS). Este detergente se une fuertemente a las proteínas, generando que las mismas asuman forma de vara. La carga negativa que el SDS le imparte a la proteína enmascara la carga intrínseca de la misma [3].

1.5 Estabilidad termodinámica

La baja estabilidad conformacional que presentan las proteínas hace que sean susceptibles a la desnaturización cuando se altera el balance entre las fuerzas débiles no covalentes encargadas de mantener su estructura nativa. Las proteínas pueden ser desnaturizadas debido a que el desplegamiento en una región dada de la estructura

proteica, desestabiliza el resto de la estructura. Existen distintos agentes que generan la desnaturalización incluyendo altas temperaturas, variación del pH, detergentes, sustancias orgánicas solubles en agua y sustancias caotrópicas. Las sustancias caotrópicas se encargan de incrementar la solubilidad de sustancias no polares en el agua, por tanto actúan disminuyendo las interacciones hidrofóbicas en la estructura proteica. Entre estos se encuentra el cloruro de guanidinio y la molécula no iónica, urea [3].

La desnaturalización proteica con cloruro de guanidinio es de 1,5 a 2,5 veces más efectiva que con urea, y esta ventaja se magnifica cuando las proteínas son más polares. La desnaturalización con este tipo de iones presenta ciertas ventajas respecto a otros métodos, (i) el producto obtenido en el proceso se define mejor que usando otros métodos, (ii) el desplegamiento es parecido a un mecanismo de dos estados, (iii) el proceso de desnaturalización suele ser reversible. Estas características son importantes para poder estimar la estabilidad conformacional de la proteína [46].

Para entender el mecanismo de desnaturalización y estabilidad proteica se requiere el conocimiento de propiedades termodinámicas (como la energía de Gibbs, la entalpia y la entropía) que caracterizan las diferencias entre el estado nativo y desnaturalizado de la proteína. Una forma de medir estas propiedades es inducir la desnaturalización con un tipo de agente que perturbe la estructura proteica, como los mencionados anteriormente, monitoreando los cambios en la población de estados. Puede seguirse por algún tipo de observable, que represente el proceso estudiado, como propiedades espectrales. El equilibrio de desnaturalización está determinado por los cambios observados en la población de estados, donde el cincuenta por ciento de éstos está constituido por la proteína nativa y el otro cincuenta por la proteína desnaturalizada, relacionados por una constante aparente de equilibrio (K) [47].

El mecanismo más simple a través del cual una proteína se desnaturaliza, es por una transición de dos estados (Ec.2), donde la proteína nativa pasa de una conformación plegada a una desplegada de forma cooperativa.



donde N refiere a la proteína en su conformación nativa, plegada, D a la proteína en su conformación desnaturalizada, desplegada y K representa la constante de equilibrio para el proceso observado, que representa el cociente entre la concentración de la proteína desnaturalizada $[D]$ y la concentración de la proteína nativa $[N]$.

La curva de desnaturalización (fig. 10) correspondiente al mecanismo más simple, mecanismo de desplegamiento bifásico donde se pasa de una conformación nativa, a baja concentración de agente desnaturalizante, con un valor de la propiedad a seguir alta, que

va disminuyendo a medida que aumenta la concentración del agente y se llega a la conformación totalmente desplegada [48].

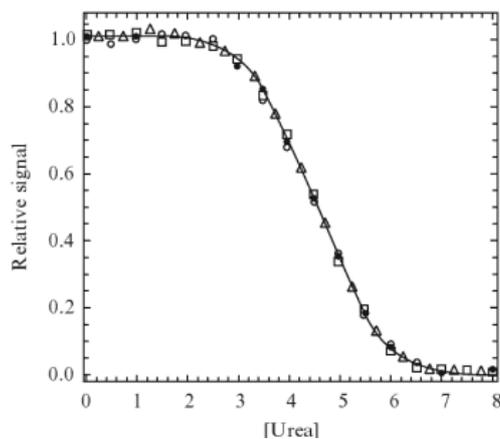
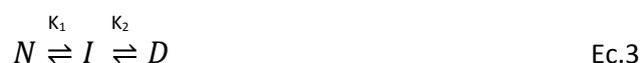


Figura 10. Curva de desnaturalización para una proteína. Se mide la señal relativa de la misma a medida que se aumenta la concentración de urea. Adaptado de referencia 24.

Para mecanismos más complejos donde el proceso de desplegamiento se realiza por una transición de tres estados, la proteína en su conformación nativa pasa a una estructura parcial intermedia antes de formar la conformación totalmente desplegada (fig. 11). Este modelo está constituido por tres estructuras en equilibrio, el equilibrio de desnaturalización se representa como,



donde N refiere a la proteína en su conformación nativa, plegada, D refiere a la proteína en su conformación desnaturalizada, desplegada y K_1 y K_2 representan las constantes de equilibrio de los procesos observados.

Para obtener los parámetros termodinámicos involucrados en estos tipos de transiciones, donde la desnaturalización de una proteína se induce mediante el agregado de concentraciones crecientes de un agente desnaturalizante, como sustancias caotrópicas, usualmente se usa el método de extrapolación lineal (LEM) [47-49]. Mediante el mismo es posible obtener la energía de Gibbs (ΔG_{H_2O}) de la desnaturalización en ausencia del agente desnaturalizante, es decir el cambio de energía de Gibbs para el proceso en estudio. Este método se basa en una relación lineal entre la variación de la energía de Gibbs con la concentración de agente desnaturalizante (Ec. 4).

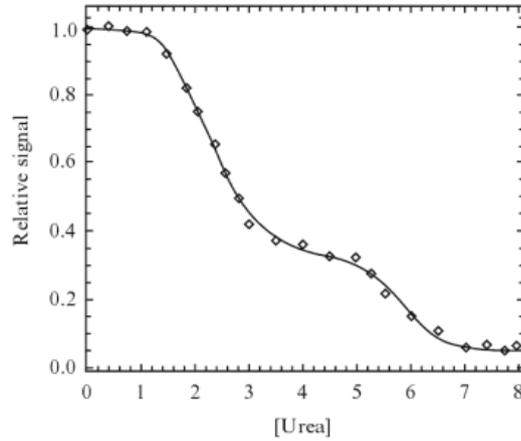


Figura 11. Curva de desnaturalización para una proteína, se mide la señal relativa de la misma a medida que se aumenta la concentración de urea. Adaptada de referencia 24.

$$\Delta G = \Delta G_{H_2O} - m [A] \quad \text{Ec.4}$$

donde ΔG_{H_2O} es la variación de energía de Gibbs en ausencia del agente desnaturalizante, m es una constante relacionada con el área accesible al solvente a cada concentración de agente y $[A]$ es la concentración del agente desnaturalizante.

Para obtener la variación de energía de Gibbs del proceso es necesario conocer la variación de la energía de Gibbs para cada concentración de agente, para esto hay que tener en cuenta la relación existente entre la variación de la energía de Gibbs y la constante de equilibrio para cada concentración de agente (Ec.5)

$$\Delta G = -RT \ln (K) \quad \text{Ec.5}$$

donde R es la constante de los gases y T es la temperatura de trabajo en grados Kelvin.

La obtención del ΔG de desnaturalización para el sistema en estudio requiere conocer la K a cada concentración de agente estudiada. Aplicando la ecuación 5 es posible obtener la ΔG a cada concentración de agente desnaturalizante y mediante LEM obtener el ΔG_{H_2O} para el proceso de desnaturalización.

Se ha demostrado que el modelo LEM para el cloruro de guanidinio no es aplicable. Debido a que la obtención de la variación de la energía de Gibbs (ΔG_{H_2O}) en ausencia de agente desnaturalizante mediante distintos modelos es sobreestimada respecto a otros métodos de desnaturalización, como la desnaturalización con urea o térmica [47].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

En este trabajo se plantea desarrollar estrategias para la purificación de la proteína antena ficocianina a partir de cápsulas comerciales de *Spirulina maxima*. Asimismo se plantea estudiar la estabilidad termodinámica de la ficocianina aislada.

2.2 Objetivos específicos

2.2a Purificar la proteína antena ficocianina mediante métodos de purificación simples y de bajo costo, como precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y cromatografía de intercambio iónico. Se pretende obtener un buen índice de pureza como también minimizar la relación entre las cantidades de ficocianina y aloficocianina.

2.2b Estudiar la estabilidad termodinámica de la ficocianina, para esto se realiza la inducción química de su desnaturalización mediante el agente caotrópico urea. A partir de este estudio se pretende obtener la energía de Gibbs del proceso de desnaturalización en ausencia del agente, como las concentraciones de urea a las cuales se da la transferencia de un confórmero de la ficocianina a otro, si están presentes en la solución.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos generales

Para el proceso de purificación de la ficocianina se partió de biomasa seca de la cianobacteria *Spirulina maxima* (*S. maxima*), obtenida a partir de cápsulas comerciales (Laboratorios Abies). En el estudio de estabilidad termodinámica se partió de la ficocianina aislada y como agente desnaturalizante se usaron soluciones del agente caotrópico urea (Baker, 99.3%) con concentraciones desde 0.5 a 8 M de urea.

3.2 Extracción

Para la obtención del extracto crudo, a partir del cual se realizó la purificación, se mezcló el contenido de tres cápsulas de *S. maxima* (aproximadamente 1 g) con 20 mL de agua miliRO, y se centrifugó a 8000g por 20 min, a temperatura ambiente. Se descartó el *pellet* y se conservó el sobrenadante, almacenándose a 4°C.

3.3 Precipitación con sulfato de amonio

La primera etapa del proceso de purificación es la precipitación con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) (Malinckrodt, 99.7 %). El fraccionamiento se realizó en dos etapas a 20 y 50 % de sulfato de amonio. En primer lugar, a 10 mL de extracto crudo se le adicionó (NH₄)₂SO₄ sólido hasta llegar a un 20% de saturación. Se dejó precipitar por 30 min a 0°C, y se centrifugó a 8000 g por 20 min a temperatura ambiente. Luego el *pellet* se disolvió en amortiguador fosfato pH 7.5 (fosfato de potasio dibásico (Baker, 99.7 %) y fosfato de potasio monobásico (Baker, 99 %)), y se almacenó, al sobrenadante se le adicionó (NH₄)₂SO₄ hasta llegar a un 50 % de saturación, se precipitó y centrifugó en iguales condiciones, almacenándose el *pellet* y el sobrenadante. Se determinó la absorbancia a través de espectros UV-Vis, y se seleccionó la fracción con mayor cociente Abs₆₂₁/Abs₂₈₀. La muestra seleccionada presentó una concentración salina alta, por lo cual fue necesario realizar un proceso de diálisis, para diluir la concentración salina en la muestra. Este procedimiento se llevó a cabo en una bolsa de diálisis adecuada, se realizaron tres cambios de 1 L de amortiguador Tris 25 mM (Beijing SBS Genetech, 99.96 %) pH 7.5 a 4°C.

3.4 Cromatografía de intercambio iónico

El segundo paso de purificación se basó en una cromatografía de intercambio iónico, empleando un intercambiador aniónico Q-Sepharose fast flow (Amersham),

previamente equilibrado en amortiguador Tris 25 mM, pH 7.5, al cual se adhiere la ficocianina, que fue posteriormente eluida con un gradiente de concentración de NaCl (0-1 M) (Sigma Aldrich, 99%) en amortiguador Tris 25 mM pH 7.5, a 4°C, colectándose 12 fracciones de 5 mL. Para seleccionar la fracción donde eluye la ficocianina y con cantidades de mínimas de contaminantes como por ejemplo aloficocianina, se realizaron espectros UV-vis desde 200 nm a 800 nm.

Por último se realizó una ultrafiltración utilizando un dispositivo Amicon Millipore (Stirred Ultrafiltration Cells, Model 8050) y membranas de celulosa regenerada con un *cut-off* de 3000 (Millipore), a partir de la cual se concentró la muestra y se diluyó la concentración salina, mediante sucesivos pasos de concentración y dilución en amortiguador Tris 10 mM pH 7.5 a 0°C y con presión.

3.5 Análisis electroforético

Se realizaron dos geles, uno desnaturizante y otro nativo, con 15 % y 8 % acrilamida/bisacrilamida, respectivamente. El gel desnaturizante presentó dodecil sulfato de sodio (SDS) 1 % (Sigma-Aldrich, 98.5 %), detergente que permite que las proteínas migren por tamaño y no por su forma y carga. Las muestras fueron preparadas en presencia o ausencia de β -mercaptoetanol, reductor de enlace disulfuro, permite dilucidar si los confórmers que forman la proteína están unidos por este tipo de enlaces a pH 8.8.

3.6 Estudio de estabilidad

En este ensayo se realizaron medidas de absorbancia a 621 nm. Se prepararon tubos, por triplicado, con un volumen final de 300 μ L, los cuales presentaron los volúmenes y concentraciones explicitados en la tabla 4 de una solución *stock* de urea 10 M en Tris 25 mM pH 7.5, ditioneitol (DTT) 1 M (Sigma-Aldrich, 99%), y amortiguador Tris 50 mM [12, 48]. Para estar seguros de que la mezcla estaba en equilibrio se dejó por 4 h, antes de realizar las medidas de absorbancia a 621 nm, ya que se ha observado que con una hora alcanza para llegar al equilibrio [12]. El ensayo se llevó a cabo a una temperatura de 22 °C, la concentración de ficocianina en cada tubo fue de 0.02 mg/mL.

La obtención de la constante de equilibrio para cada concentración de agente desnaturizante, se basa en seguir la absorbancia a 621 nm de la ficocianina, la cual disminuye cuando la proteína es desnaturizada. En base a esto y teniendo en cuenta que la fracción nativa (f_n) mas la fracción desnaturizada (f_d) es uno, y que dichas fracciones se obtienen como $f_d = (Y - Y_n) / (Y_d - Y_n)$ y $f_n = (Y_d - Y) / (Y_d - Y_n)$ [46], donde Y representa la medida de un observable que simboliza el proceso observado a

una concentración dada de agente (Abs_{621}). Yn representa la absorbancia de la proteína nativa, puede aproximarse a la absorbancia de la ficocianina a concentración nula de agente (Abs_{621}^0), mientras que Yd es la absorbancia de la ficocianina desnaturalizada, puede aproximarse a la absorbancia al infinito debido a que la misma no tiende a cero, a altas concentraciones de agente desnaturalizante, a causa de la existente absorción de las subunidades α y β de la ficocianina desnaturalizada (Abs_{621}^∞) (tabla 2).

$$K = \frac{fd}{fn} = \frac{fd}{(1-fd)} = \frac{(Abs_{621}^0 - Abs_{621})}{(Abs_{621} - Abs_{621}^\infty)} \quad \text{Ec.6}$$

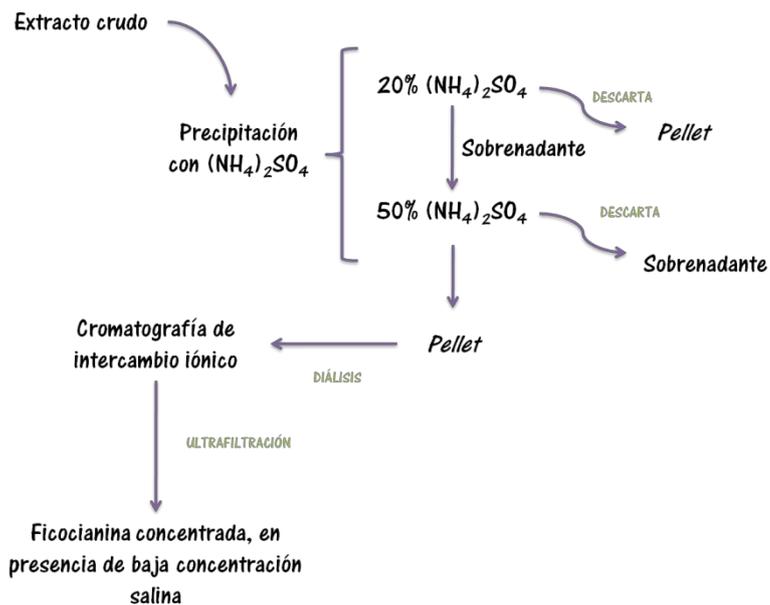
Tabla 4. Volúmenes y concentraciones de los reactivos utilizados para el estudio de la estabilidad termodinámica de la ficocianina.

Tubos	Urea (M)	Amortiguador Tris 50 mM (μ L)	DTT (μ L)	Ficocianina (μ L)
1	0	239	1	60
2	0.5	224	1	60
3	1.0	209	1	60
4	1.5	194	1	60
5	2.0	179	1	60
6	2.5	164	1	60
7	3.0	149	1	60
8	3.5	134	1	60
9	4.0	119	1	60
10	4.5	104	1	60
11	5.0	89	1	60
12	5.5	74	1	60
13	6.0	39	1	60
14	6.5	44	1	60
15	7.0	29	1	60
16	7.5	14	1	60
17	8.0	0	1	60

4 RESULTADOS

4.1 Proceso de purificación

Para realizar el proceso de purificación se siguieron distintas técnicas de fraccionamiento, como precipitación con sulfato de amonio, diálisis, cromatografía de intercambio iónico y ultrafiltración. El procedimiento general llevado a cabo puede observarse en el esquema 2. Los resultados de cada etapa en este proceso se desarrollan en esta sección.



Esquema 2 Procedimiento llevado a cabo para la purificación de la ficocianina.

4.1a Extracción

Para seguir el proceso de extracción se realizaron espectros (fig. 12) del extracto crudo de *S. maxima*, obtenido como el sobrenadante de la centrifugación de la masa seca de *Spirulina* disuelta en agua miliRO, entre 200-800 nm, observándose la presencia de un pico de absorbancia a 621 nm. Mediante este espectro se pudo verificar la presencia de ficocianina en solución como también la presencia de muchos contaminantes, pues había una absorbancia elevada a aproximadamente 280 nm, o sea una gran cantidad de proteínas totales en solución.

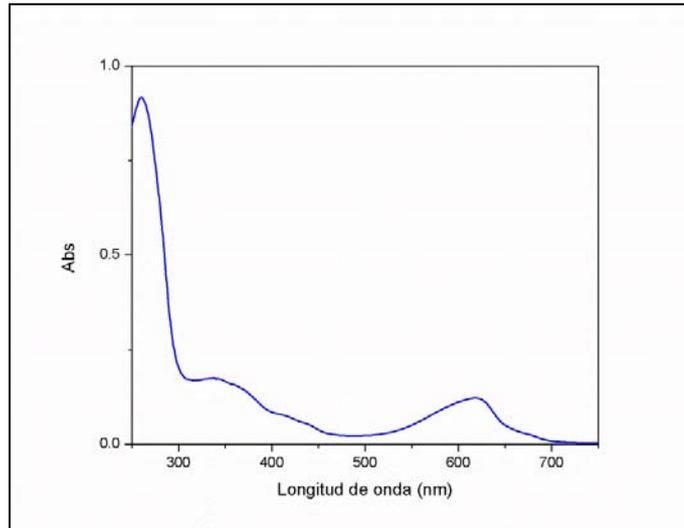


Figura 12. Espectro de absorción del sobrenadante obtenido luego de la extracción.

4.1b Precipitación con sulfato de amonio

La precipitación con sulfato de amonio se monitoreó registrando espectros UV-vis desde 200 nm a 800 nm (fig. 13). Para elegir la fracción con la cual se siguió la purificación se optó por aquella que presentó un buen equilibrio entre los cocientes Abs_{621}/Abs_{652} (a mayor cociente menor presencia de aloficocianina), y Abs_{621}/Abs_{280} (a mayor cociente menor cantidad de contaminantes proteicos). También se consideró la cantidad de ficocianina en solución. Teniendo en cuenta estas características se optó por la fracción *pellet* a 50 % de sulfato de amonio.

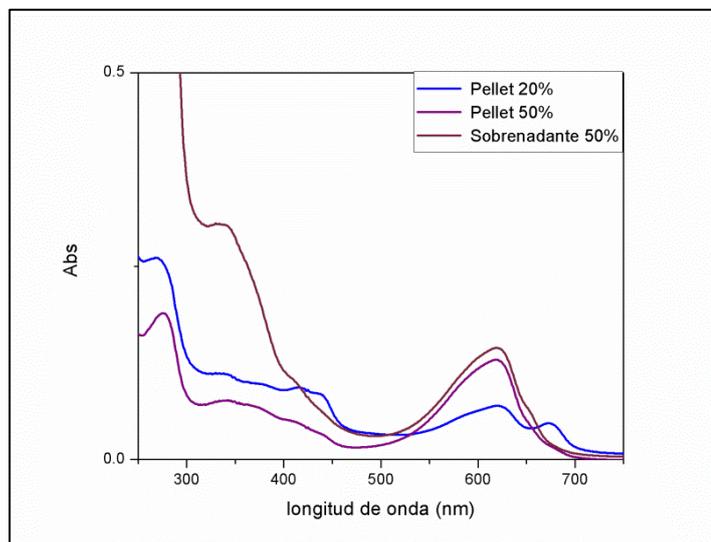


Figura 13. Espectro de absorción para el pellet con una saturación del 20 % y 50 %, y sobrenadante con una saturación del 50 % de sulfato de amonio.

Se optó por la fracción *pellet* 50 % aunque no es la fracción con mayor absorbancia a 621 nm, esta decisión se basó en la presencia de menor cantidad de contaminantes a 280 nm como también en la presencia de un hombro menos pronunciado a 652 nm que en el sobrenadante 50 % . Esta decisión se verificó con los cocientes antes mencionados. Para verificar la decisión tomada se calcularon los cocientes antes mencionados (tabla. 5).

Tabla 5. Cantidades relativas de ficocianina respecto a la cantidad de proteínas totales y aloficocianina.

Fracción	Abs_{621}/Abs_{280}	Abs_{621}/Abs_{652}
<i>Pellet</i> 20 %	0.28	1.71
<i>Pellet</i> 50 %	0.69	2.71
Sobrenadante 50 %	0.12	2.22

Mediante lo observado en la figura 13 y los valores mostrados en la tabla 5 se concluye que la fracción más favorable para seguir con la purificación es el *pellet* 50 % ya que presenta el mejor equilibrio entre la cantidad de ficocianina y proteínas totales así como entre la ficocianina y la aloficocianina.

4.1c Cromatografía de intercambio iónico

Según el esquema 2, luego de realizar la precipitación se llevó a cabo una diálisis de la fracción seleccionada, debido a que la misma presenta alta concentración salina, lo cual perjudicaría el correcto pegado de la ficocianina al intercambiador de la columna. Posteriormente se siguió con la cromatografía. En primer lugar se pegó la proteína al intercambiador, permitiendo así que los contaminantes que no presentan afinidad por éste eluyan con el amortiguador de carga. Luego con el gradiente salino comienzan a eluir otros contaminantes de la muestra como algo de ficocianina, esto se observó para las primeras fracciones obtenidas 1-4 donde no se observa un máximo pronunciado a 621 nm pero sí algo de absorbancia, por tanto la ficocianina no es predominante en estas fracciones (fig. 14).

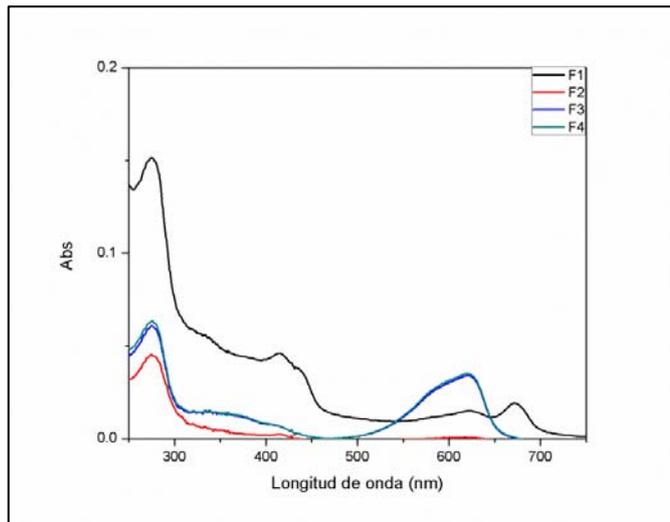


Figura 14. Espectro de absorción de las fracciones 1-4

En las fracciones 5-9 se observó la presencia de la ficocianina, debido que a altas concentraciones salinas los iones de la solución compiten por las regiones de unión del intercambiador, a los cuales se encuentra unida la ficocianina por interacciones electrostáticas (fig. 15) .

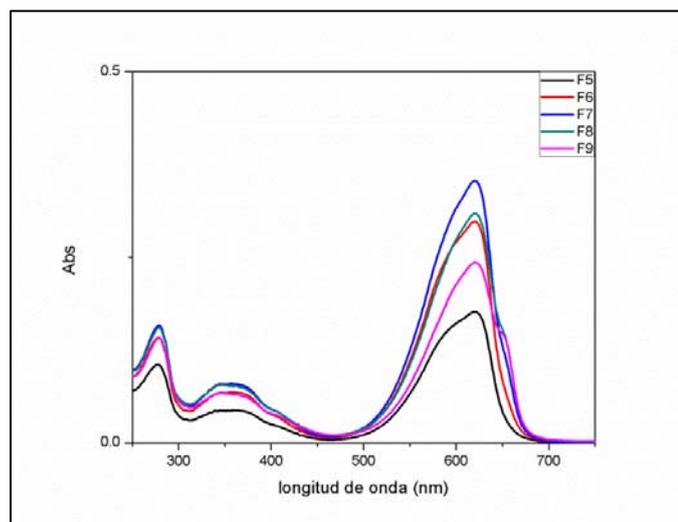


Figura 15. Espectro de absorción de las fracciones 5-9

Realizando un cromatograma (fig. 16) se puede observar la cantidad relativa de ficocianina, aloficianina y proteínas totales a 280 nm en cada fracción obtenida de la

columna. A partir de este gráfico se puede discernir cuales son la fracciones elegidas para continuar con el proceso de purificación.

Las fracciones (fig. 16) más relevantes para seguir con la purificación son aquellas con un equilibrio adecuado entre la cantidad de ficocianina, aloficocianina y proteínas totales a 280 nm, de forma similar a como se procedió para la elección de la fracción adecuada en el proceso de precipitación.

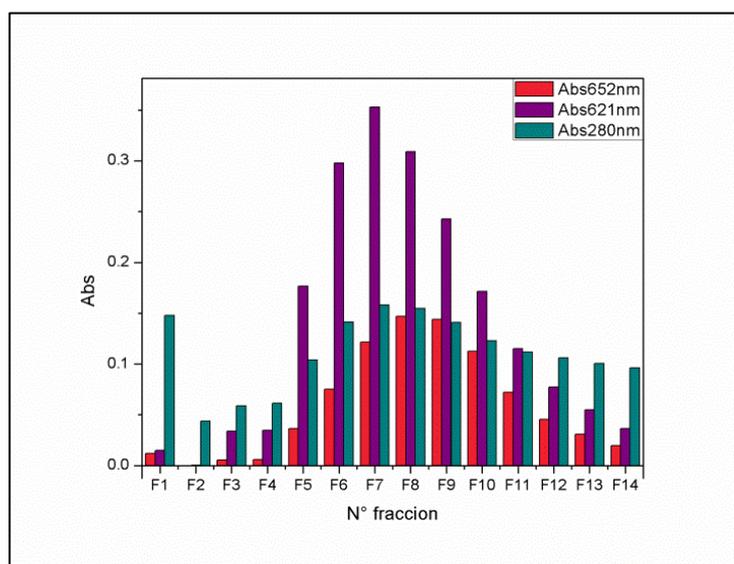


Figura 16. Cromatograma donde se muestra la absorbancia a 621 nm (ficocianina), absorbancia a 280 nm (proteínas totales) y a 652 nm (aloficocianina).

En este caso se optó por las fracciones 5-7, según el cromatograma presentan el equilibrio más adecuado entre la ficocianina, proteínas totales y aloficocianina. Las fracciones 8 y 9 presentan alta concentración de ficocianina pero a su vez presentan aloficocianina y proteínas totales a 280 nm. En la figura 16 se muestra que a partir de la fracción 8 se da la aparición de un hombro a 652 nm correspondiente a la aloficocianina.

Para verificar cuáles son las fracciones en las que está presente la aloficocianina se realizó la derivada segunda de las fracciones seleccionadas. En la figura 17 se muestra la derivada segunda de la fracción 6 donde sólo se observa la presencia de un antipico correspondiente al pico a 621 nm de la ficocianina, mientras que en la figura 18 se muestra la derivada segunda para la fracción 8 donde se observa la presencia de dos antipicos correspondientes a la presencia tanto de ficocianina como de aloficocianina.

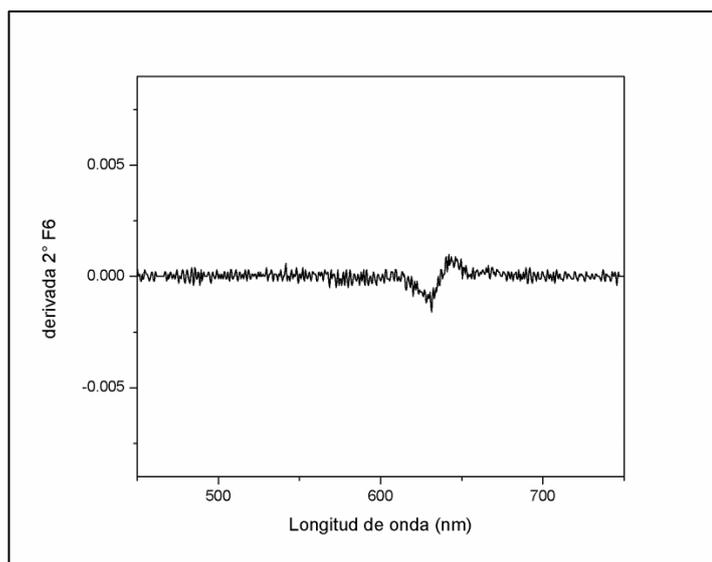


Figura 17. Derivada segunda del espectro para la fracción 6 de la columna.

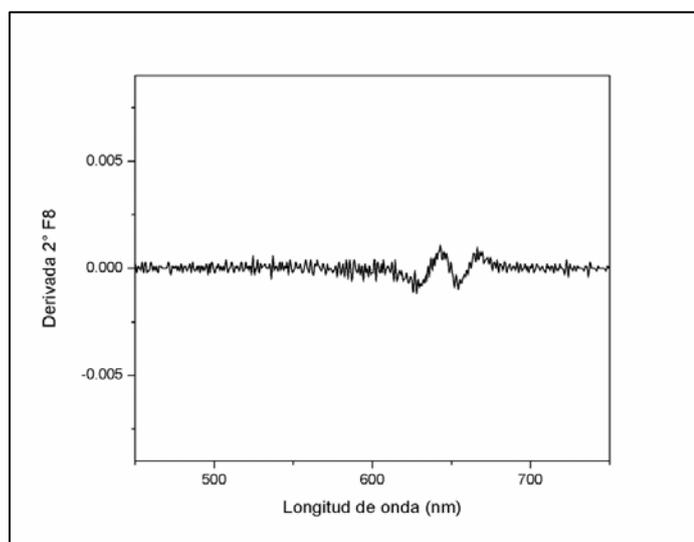


Figura 18. Derivada segunda del espectro para la fracción 8 de la columna.

Las fracciones elegidas (5-7) se sometieron a una ultrafiltración para de esta manera concentrar la muestra y disminuir la concentración salina del medio. De esta manera la ficocianina obtenida está disponible para su uso.

El proceso de extracción y purificación se siguió mediante medidas de absorbancia a 621 nm, 280 nm y 652 nm, correspondientes a la ficocianina, proteínas totales y aloficocianina. Mediante estos valores se obtienen parámetros importantes para el seguimiento de la purificación como índice de pureza, factor de purificación, porcentaje de rendimiento, los cuales se reportan en la tabla 6. A partir de los datos obtenidos se

concluye que la etapa donde se da una mayor pérdida de ficocianina es la precipitación, ya que se obtiene un porcentaje de rendimiento del 53 %.

Tabla 6. Seguimiento de la purificación, se reportan los parámetros más relevantes del proceso.

	Extracción	Precipitación	Intercambio iónico	Ultrafiltración
Abs 621*	0.734	0.385	0.276	0.686
Abs 652*	0.283	0.142	0.077	0.299
Abs 280*	3.727	0.556	0.135	0.622
[ficocianina] (mg/mL)	0.112	0.059	0.044	0.102
Volumen final (mL)	10	10	5	2
Cantidad (mg)	1.122	0.595	0.224	0.204
Rendimiento %	100	53	20	18
Índice de pureza	0.19	0.69	2.04	1.1
Factor de purificación	1	3.6	10.7	5.7

* Valores de absorbancia corregidos por el factor de dilución.

La inclusión de la etapa de intercambio iónico resultó muy positiva para la purificación ya que se obtuvo un aumento en el valor del factor de purificación de 8.2, si se considera el valor promedio de los factores de purificación para el intercambio iónico y la ultrafiltración. Es necesario promediar los valores de ambas etapas por la discrepancia observada entre los valores del factor de purificación para el intercambio iónico y la ultrafiltración (tabla 6), ya que en la última etapa se observa una disminución del mismo. Esta disminución en el factor de purificación y en el índice de pureza no es esperable y se atribuye a errores o artefactos en la obtención de los espectros. Se cree que la disminución observada puede ser causada por el fenómeno de dispersión, en particular a la dispersión de Rayleigh [50]. En la figura 19 se muestra el espectro de absorción para la ultrafiltración.

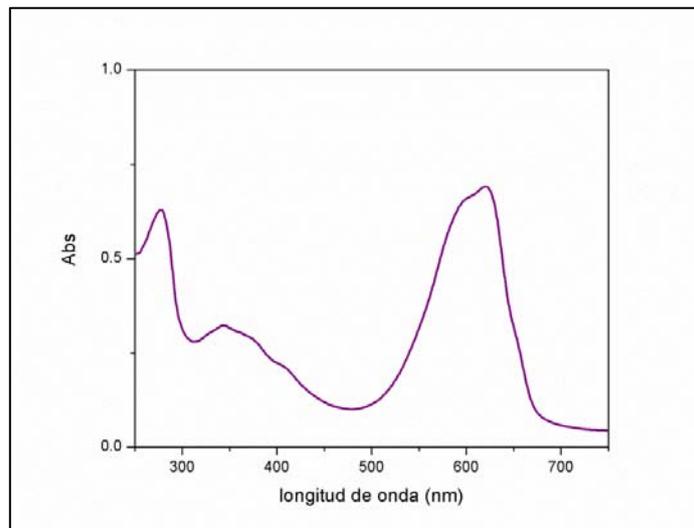


Figura 19. Espectro de absorción de la ultrafiltración

Por tanto el proceso de purificación fue satisfactorio, aunque se pretende optimizar la precipitación para que la pérdida de ficocianina sea menor al 50 % en esta etapa.

4.1d Verificación de la pureza

Para verificar el proceso de purificación y estimar el peso molecular de las subunidades se realizaron dos geles, uno nativo para observar la presencia de posibles multímeros de la ficocianina, y otro desnaturizante para observar si hay contaminantes en la muestra y conocer el peso molecular del material obtenido. Adicionalmente a algunas de las muestras del gel desnaturizante se les agregó β -mercaptoetanol para saber si los multímeros que se forman están unidos por enlaces disulfuros. Los resultados del gel nativo (fig. 20), sugieren la presencia de más de un multímero en las condiciones de electroforesis, ya que se observa más de una banda. Una de estas se encuentra bien definida, formada presumiblemente por un único multímero, mientras que la otra, de resolución difusa, correspondería a una fracción de mayor peso molecular, probablemente formada por uno o más multímeros. Una de las razones por la cual no se resuelve bien, podría ser por re-equilibramiento durante el proceso de electroforesis.

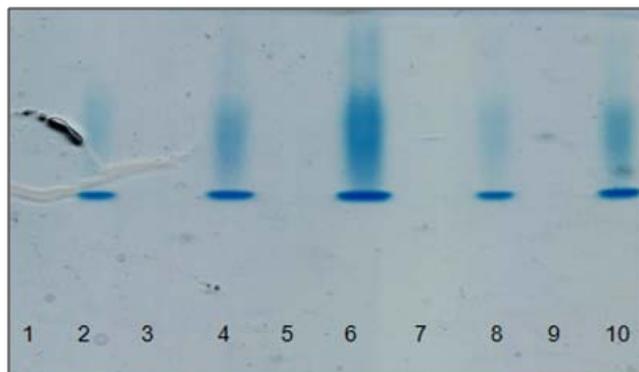


Figura 20. Electroforesis en condiciones nativas a pH 8,5 con 8% de acrilamida, los carriles 2, 4, 6, 8, 10 presentan 1.2, 2.3, 4.6, 1.2 y 2.3 μg de ficocianina, respectivamente. Las proteínas se tiñieron con colorante Coomassie coloidal.

En el gel desnaturizante sin teñir (fig. 21) se observa una única banda de color azulado, la cual podría corresponderse con las subunidades que forman a la ficocianina. En el gel desnaturizante teñido con azul brillante de coomasie se observan cuatro bandas de distintos pesos moleculares (fig. 22), para conocer el peso molecular de estas bandas y poder concluir que el proceso de purificación fue exitoso, a partir del patrón de peso molecular se realizó un gráfico de $\log(\text{PM})$ vs. distancia migrada (fig. 23).

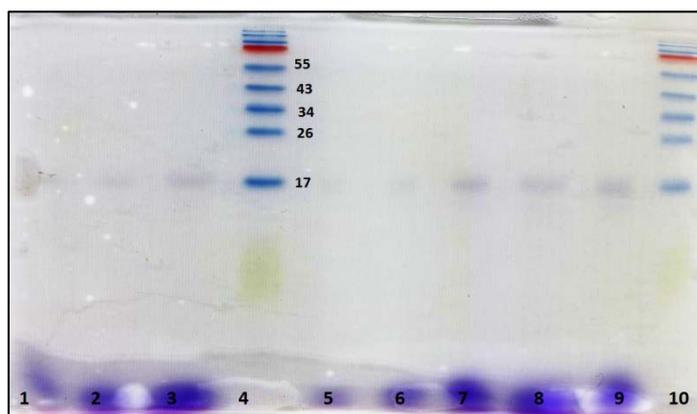


Figura 21. Electroforesis en condiciones desnaturizantes, sin teñir, con 15% de acrilamida. Los carriles 1, 2 y 3 presentan 1.2, 2.3 y 4.6 μg de ficocianina, respectivamente en presencia de β -mercaptoetanol. Los carriles 4 y 10 presentan 5 y 2 μL de marcador de peso molecular, a la derecha del carril 4 se observan los pesos moleculares expresados en kDa. Los carriles 5, 6, 7, presentan 1.2, 2.3 y 4.6 μg en ausencia de β -mercaptoetanol. Por últimos los carriles 8 y 9 presentan 4,6 μg en presencia y ausencia de β -mercaptoetanol.

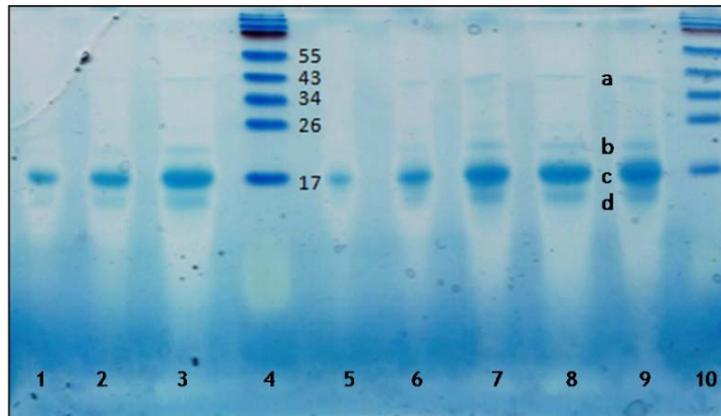


Figura 22. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes con 15% de acrilamida, los carriles 1, 2 y 3 presentan 1.2, 2.3 y 4.6 μg de ficocianina, respectivamente en presencia de β -mercaptoetanol. Los carriles 4 y 10 presentan 5 y 2 μL de marcador de peso molecular, a la derecha del carril 4 se observan los pesos moleculares expresados en kDa. Los carriles 5, 6, 7, presentan 1.2, 2.3 y 4.6 μg en ausencia de β -mercaptoetanol. Por últimos los carriles 8 y 9 presentan 4,6 μg en presencia y ausencia de β -mercaptoetanol. Las proteínas se tñieron con colorante Coomassie coloidal.

Según el gráfico log (PM) vs. distancia migrada (fig. 23) se estimaron los valores de peso molecular para las bandas **a**, **b**, **c** y **d**, que resultaron de 43, 22.6, 17.1 y 14 kDa, respectivamente. No se obtuvieron diferencias en presencia y ausencia de β -mercaptoetanol.

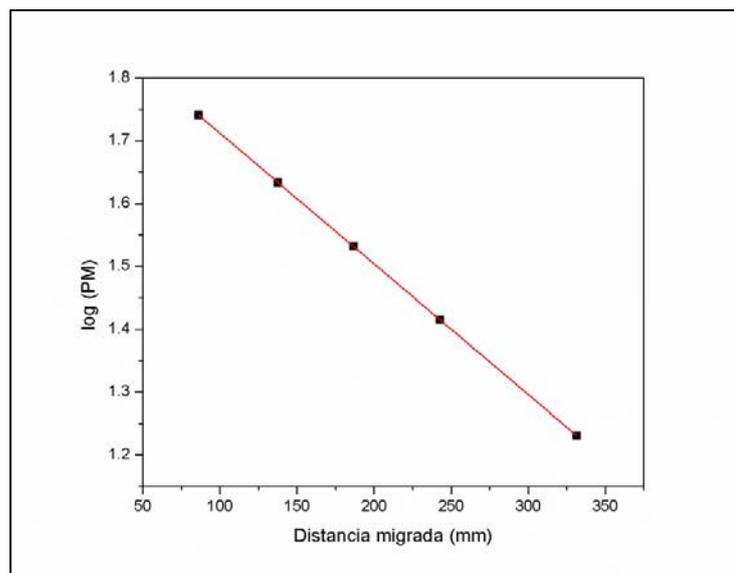


Figura 23. Curva de calibración para la obtención de los pesos moleculares aproximados para las bandas observadas en el gel desnaturizante. Esta curva se obtiene a través del patrón de peso molecular. Este gráfico presenta una ecuación de la recta igual $\log (\text{PM}) = -0.002 * \text{distancia migrada} + 1.92$.

4.2 Estudio de estabilidad termodinámica

El estudio de la estabilidad termodinámica se siguió a través de la absorbancia a 621 nm (máximo de absorción de los espectros de desnaturalización a las concentraciones de urea propuestas), como se explicó en Materiales y Métodos, para la obtención de la constante de equilibrio del proceso observado a cada concentración de agente desnaturizante, en este caso urea. Por lo tanto y como consecuencia de la presencia de concentraciones variables de urea las constantes determinadas son constantes de equilibrio aparentes. En este trabajo se optó por la desnaturalización mediante urea debido a la desventaja que presenta el cloruro de guanidinio para la obtención de parámetros termodinámicos [47]. Es importante destacar que en este tipo de estudios es necesario trabajar con la actividad de la urea y no con la molaridad como unidad de concentración para que las constantes de equilibrio del sistema en estudio sean termodinámicamente correctas, como también es necesario tomar en cuenta el efecto de la fuerza iónica en el proceso de desnaturalización [51]. En este trabajo se optó por trabajar con la concentración de urea en molaridad y no actividad, debido a que las transiciones reportadas en bibliografía se encuentran en molaridad, por tanto se requieren los valores en estas unidades para poder compararlos con aquellos reportados.

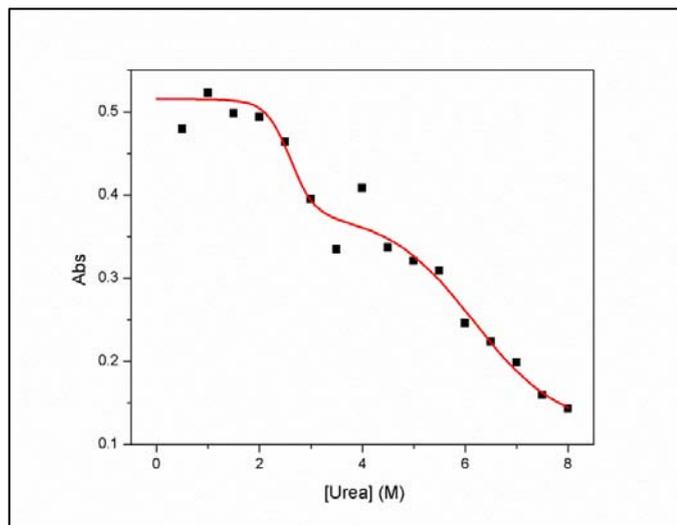


Figura 24. Curva de desnaturalización obtenida para la ficocianina purificada en presencia de concentraciones crecientes de urea. Se observan dos transiciones para el proceso estudiado.

Existen dos transiciones en el proceso en estudio (fig. 24), por tanto el mismo se asemeja a la transición de tres estados explicada en la introducción, donde la proteína nativa pasa de una estructura superior a un intermediario y del mismo a la proteína desnaturalizada. Conociendo los confórmeros que puede formar la ficocianina y observando sólo dos transiciones, en los gráficos de desnaturalización (fig. 24) se puede suponer que la primera transición se corresponde con el paso del trímero al monómero (heterodímero) y la segunda al paso del monómero a las subunidades que los forman que posteriormente se desnaturalizan. Se descarta la presencia del hexámero en solución, debido a la concentración de ficocianina a la cual se realiza el ensayo, ya que la presencia del hexámero se ve favorecida a concentraciones mayores a 1 mg/mL mientras que en este caso la concentración era de 0.02 mg/mL. Las transiciones observadas se corresponden con los valores de concentración de urea 2.6 M y 6.12 M.

Aplicando la ecuación 6 es posible obtener los valores de K para las transiciones en estudio, y a través de los mismos aplicando la ecuación 5 se obtienen los valores de ΔG a cada concentración de urea usada (tabla 7).

Tabla 7. Valores de la constante de equilibrio aparente promedio (K_{prom}) y la variación de la energía de Gibbs promedio (ΔG_{prom}) para cada concentración de urea estudiada.

Urea (M)	K_{prom}	ΔG_{prom} (kJ/mol)
0	-	-
0.5	0.130	5.013
1.0	-	-
1.5	0.071	6.499
2.0	0.085	6.056
2.5	0.185	4.146
3.0	0.510	1.654
3.5	0.984	0.039
4.0	0.433	2.056
4.5	0.963	0.093
5.0	1.138	-0.318
5.5	1.292	-0.629
6.0	2.695	-2.436
6.5	3.722	-3.229
7.0	5.832	-4.332
7.5	22.448	-7.644
8.0	-	-

Mediante los valores expuestos en la tabla 7 es posible aplicar el método de extrapolación lineal (LEM) y así obtener el valor de para las transiciones estudiadas (figs. 25 y 26).

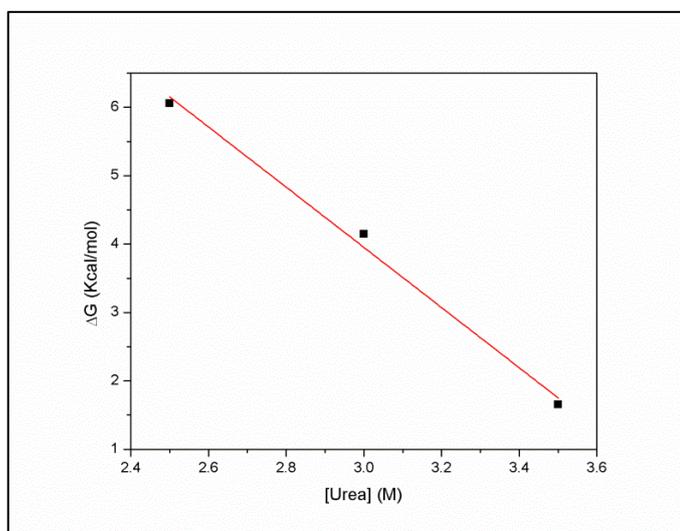


Figura 25. Gráfico de la variación en la energía de Gibbs en función de la concentración de urea para la primera transición, paso de trímero a monómero. Ecuación de la recta $y = -4.4x + 17.16$.

Para la primera transición del proceso de desnaturalización (fig. 24), paso de trímero al monómero, se obtuvo un $\Delta G_{H_2O} = 17.16$ kJ/mol.

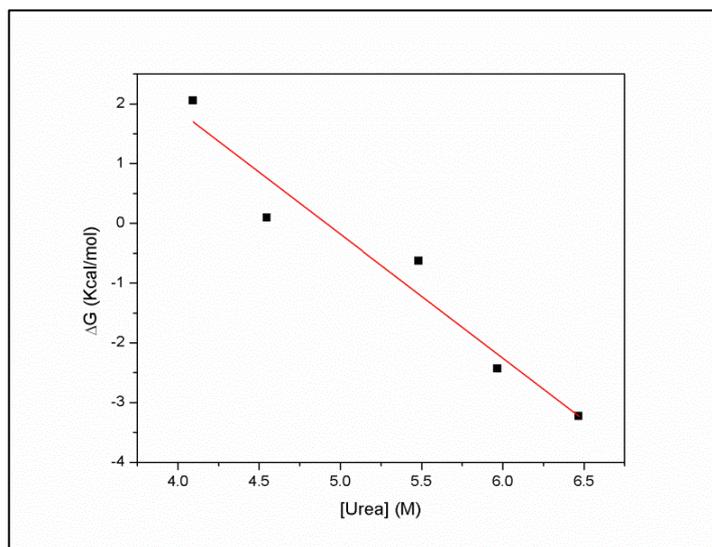


Figura 26. Gráfico de la variación en la energía de Gibbs en función de la concentración de urea para la segunda transición, paso de monómero a subunidades. Ecuación de la recta $y = -2.07 x + 10.19$.

Para la primera transición del proceso de desnaturalización (fig. 24), paso del monómero a las subunidades que lo conforman y la desnaturalización de éstas, se obtuvo un $\Delta G_{H_2O} = 10.19$ kJ/mol.

5 DISCUSIÓN

5.1 Purificación de ficocianina

El proceso de purificación fue exitoso debido a que se logró aislar ficocianina relativamente pura obteniéndose un índice de pureza apropiado para uso alimentario igual 1.57. Este valor no se muestra en la tabla 6 debido a que fue obtenido como el promedio entre los valores del índice de pureza obtenido para el intercambio iónico y la ultrafiltración. Como se explicó en resultados se reporta el promedio por las discrepancias obtenidas entre los valores del índice de pureza para las etapas intercambio iónico y ultrafiltración (tabla 6).

Al comparar los métodos de fraccionamiento usados en este trabajo con aquellos descritos en la literatura se obtienen índices de pureza mayores respecto a los obtenidos en la purificación de la ficocianina. Como por ejemplo mediante la precipitación con sulfato de amonio se observan índices iguales a 0.86, 0.88, 1.32, 1.26, 2.66, respecto al obtenido en este trabajo que fue de 0.69. Resultados similares se obtienen cuando se observan los índices obtenidos luego de la cromatografía de intercambio iónico, con índices iguales a 3.04, 3.3, 4.42, respecto al obtenido en este trabajo igual a 2.04 [24, 40, 41, 52, 53]. Usando otros tipos de técnicas también es posible obtener índices que superen el grado analítico, como por ejemplo la cromatografía de interacción hidrofóbica, donde se llega a un índice de pureza igual a 4.5 [26].

Las diferencias observadas en los índices de pureza pueden atribuirse a distintos factores como (i) especie de la cianobacteria usada para la extracción, (ii) naturaleza del extracto, puede usarse como biomasa seca o húmeda y (iii) método de extracción de la ficocianina a partir de las cianobacterias.

La especie de la cianobacteria aporta a las diferencias observadas en los índices de pureza debido a que se ha observado que realizando iguales métodos para la extracción de una misma biliproteína en distintas especies no se obtienen iguales resultados, esto se debe a que varias especies de cianobacterias presentan la capacidad de producir ficocianina, no todas la producen con igual eficiencia ni tampoco la optimización de las condiciones de cultivo generan los mismos resultados [24, 54]. La naturaleza del extracto genera mayores diferencias en los rendimientos obtenidos. Estas diferencias se deben a que el uso de biomasa seca disminuye en un 50 % la obtención de ficocianina respecto al uso de biomasa húmeda. Como también los métodos de secado de la materia genera cambios en las propiedades espectroscópicas de la ficocianina, por ejemplo cuando se hace el espectro de la ficocianina obtenida a través de biomasa húmeda sólo se observan un pico a 621 nm mientras que al realizar el espectro de ficocianina obtenida de biomasa seca se observa un pico adicional a 652 nm correspondiente con la aloficocianina [55]. Esto se

observa en los resultados obtenidos ya que un importante contaminante en las muestras estudiadas fue la alofocianina, debido a que el extracto crudo presenta una relación A_{621}/A_{652} igual a 2.25 lo que indica una presencia minoritaria de alofocianina. Por último los métodos de extracción también generan diferencias en los rendimientos de la ficocianina obtenida como también cambios en sus propiedades espectroscópicas. Otro factor que puede ampliar las diferencias observadas es la optimización de la extracción de ficocianina a partir del cultivo de cianobacterias, este procedimiento no se comporta de la misma forma entre distintas especies de cianobacterias. Para esto se sigue la producción a lo largo de los días que se crece el cultivo, de esta forma es posible extraer la ficocianina cuando el cultivo presenta cantidades máximas [52, 55, 56]

Teniendo en cuenta los factores que causan diferencias en los índices de pureza se puede concluir que la purificación de la ficocianina fue satisfactoria ya que se obtuvieron buenos índices de pureza para los métodos de fraccionamiento utilizados. Es importante destacar que en este trabajo se parte de biomasa seca lo cual baja el rendimiento de la ficocianina que se puede obtener. Por otra parte considerando los materiales de partida y los métodos de fraccionamiento llevados a cabo se realizó un proceso de purificación de bajo costo, fácil de implementar y de buenos rendimientos. El bajo costo en parte se debe a que la biomasa seca se obtuvo a partir de cápsulas de la cianobacteria *Spirulina maxima*, que se comercializan habitualmente en farmacias. El costo de un frasco de *S. maxima* es de aproximadamente \$300, los cuales presentan 60 g de cianobacteria. La forma de obtención de la biomasa seca además de reducir los costos de la purificación reduce los tiempos de la purificación, ya que no es necesario cultivar las cianobacterias. Los métodos de fraccionamiento también contribuyen al bajo costo del proceso, debido a que los reactivos usados no son difíciles de obtener y a que es posible la re-utilización de la cromatografía de intercambio iónico, que presenta un alto costo por el tipo de resina utilizada.

El fraccionamiento en este trabajo se realizó en dos etapas, una a 20 % de sulfato de amonio y otra a 50 %, se optó por la fracción *pellet* 50 %, donde precipitó la ficocianina y presentó un buen índice de pureza. En la bibliografía realizan este tipo de fraccionamiento con las mismas etapas, como también realizan fraccionamiento con etapas a 20 % y 70 % de sulfato de amonio. La opción utilizada en la bibliografía puede aumentar los rendimientos en la obtención de la ficocianina pero no en la pureza de la misma. Como se muestra en la figura 13 la fracción sobrenadante 50 % presenta un buen valor de absorbancia a 621 nm, aún mayor que el observado para la fracción *pellet* 50 %, pero también presenta una alta absorbancia a 280 nm, al contrario de lo observado para el *pellet* 50 % donde la absorbancia a 280 nm es muy baja. Esto se refleja en los índices de pureza reportados, por ejemplo en este trabajo se obtuvo un índice de pureza de 0.69, sin embargo en la bibliografía para las etapas a 20 % y 70 % de sulfato de amonio se observan índices de 0.86 y de 1.26, en ambos trabajos parten de biomasa húmeda de cianobacteria y en el que se observa mayor índice de pureza realizan una optimización de la extracción de

ficocianina [26, 52]. Por tanto las etapas realizadas en este trabajo fueron satisfactorias debido al índice de pureza obtenido. Para una próxima purificación podría realizarse un corte a 25 % de sulfato de amonio para que precipiten una mayor cantidad de proteínas contaminantes, como también un segundo corte a 60 % de sulfato de amonio para así disminuir la pérdida de ficocianina en este paso de purificación, donde se observó un 53 % de rendimiento.

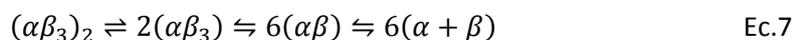
A partir de la elución de la cromatografía de intercambio iónico con gradiente de NaCl 0-1 M se obtuvieron las fracciones con mejores índices de pureza, pero estos no son tan buenos como los observados en la bibliografía. Aunque no se parte de los mismos sistemas que en la bibliografía, en muchos de estos trabajos realizan la elución con NaCl con un rango de concentraciones menor, como por ejemplo rangos de 0-0.5 M de NaCl [52]. Realizando pequeños incrementos en la concentración de NaCl se podría obtener una separación con mayor discriminación entre la afinidad de la resina por distintas proteínas, lo que podría permitir la obtención de mayores índices de pureza que los obtenidos en este trabajo.

A partir de la verificación del proceso de purificación, electroforesis desnaturante (figs. 21 y 22) y el índice de pureza, se observa que se logró purificar la ficocianina, también se observó la presencia de la aloficocianina y de tres proteínas desconocidas. Estos resultados se verificaron a través de los pesos moleculares obtenidos, comparando con los datos extraídos de la bibliografía se puede concluir que en la muestra purificada se encuentra presente aloficocianina [24, 26, 56, 57]. El peso molecular obtenido para las subunidades de la aloficocianina a través de la secuencia primaria mediante el servidor EXPASY, fue de 17.67 kDa y de 17.83 kDa para la subunidad α y β , respectivamente. La banda **c** de 17 kDa sólo puede relacionarse con las subunidades de la ficocianina y aloficocianina, la presencia de subunidades de distintos pesos moleculares (17-19 kDa) se ve reflejada en el ancho de la banda. En la electroforesis desnaturante sin teñir (fig. 21), se observa que sólo la banda **c** presenta un color azulado, es posible inducir que allí es donde se encuentran proteínas que tienen un cromóforo asociado, en este caso la ficocianina y aloficocianina. Por tanto, según la electroforesis desnaturante, teñida y sin teñir, no puede concluirse la cantidad de aloficocianina presente. Las bandas **a**, **b** y **d** se asocian a proteínas contaminantes.

5.2 Estudio de estabilidad termodinámica

Mediante la inducción de la desnaturación de la ficocianina purificada, a través del agente caotrópico urea, se obtuvieron dos transiciones claras (fig. 24). Como se explicó anteriormente la ficocianina en solución puede encontrarse como un equilibrio de hexámeros, trímeros y monómeros. Los pasos de desnaturación del sistema en estudio

se observa en la ecuación 7, donde del hexámero se pasa al trímero, de éstos a los monómeros y como último paso, del monómero a las subunidades α y β y la subsecuente desnaturalización de éstas.



Por tanto observando el perfil obtenido se concluye que la última transición observada, debe corresponderse con el paso del monómero a las subunidades y la subsecuente desnaturalización de estas ya que es la última transición observada en el sistema en estudio. Por tanto, según la ecuación 7 la primera transición debe corresponderse con el paso del trímero al monómero. Si en la muestra purificada existiera la presencia del hexámero de ficocianina, en el perfil de desnaturalización deberían observarse tres transiciones y no dos como las observadas en este trabajo. Las concentraciones de urea donde se dan las transiciones son 2.60 M y de 6.12 M. En bibliografía [12] los valores de concentración de urea son de 1.1 M para la primer transición y 5.4 M para la segunda transición, lo cual puede deberse a la fuente de ficocianina usada ya que esto puede variar levemente la concentración de las transiciones como también las condiciones del ensayo como por ejemplo la temperatura del mismo. De cualquier forma en la bibliografía reportada esperarían, por estudios de concentraciones de cada confórmero, encontrar la transición donde se pasa de trímero a monómero en 2.6 M, concentración coincidente con a la observada en este trabajo.

Al aplicar el método de extrapolación lineal se obtuvieron los valores de la energía de Gibbs para el proceso de disociación del trímero en los monómeros y para el proceso de disociación de los monómeros en sus subunidades y la consecuente desnaturalización de las mismas. Estos valores fueron para la disociación del trímero $\Delta G_{H_2O} = 17.16$ kJ/mol y para la disociación del monómero $\Delta G_{H_2O} = 10.19$ kJ/mol. En bibliografía [20] sólo se encuentran reportados los valores para la disociación del monómero en las subunidades que la componen, éstos son mayores a los obtenidos en este trabajo, alrededor de 42 kJ/mol. Las diferencias en la energía de Gibbs para la disociación del monómero pueden ser causa de las diferencias en el ensayo que pueden generar diferencias en el establecimiento de los equilibrios y las constantes que los identifican.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos es posible estimar cuál fue confórmero predominante obtenido en la muestra purificada, sin la necesidad de realizar métodos que confirmen el peso molecular del confórmero purificado. Para esto es necesario tener en cuenta que las condiciones en las que el ensayo se llevó a cabo permitieron favorecer la presencia del trímero, debido a que se trabajó a concentraciones salinas bajas, pH mayores a 7 y concentraciones de ficocianina bajas menores a 1 mg/mL

[12, 18-20]. Observando el perfil de desnaturalización fue posible identificar la presencia del trímero como el confórmero superior en la muestra. En el gel nativo (fig. 9) se puede observar la presencia de un confórmero predominante con una banda de buena resolución y otra de mayor peso pero mucho más difusa, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la desnaturalización y las condiciones del ensayo se puede atribuir que la banda bien definida corresponde al trímero y la que no logra definirse bien se atribuye a la presencia de proteínas contaminantes, bandas **a**, **b** y **d**, como también la presencia de algo de hexámero de ficocianina (fig. 21).

6 CONCLUSIONES

Se realizó un proceso de purificación de bajo costo, fácil de implementar y de corta duración, debido a las características de los métodos de fraccionamiento empleados. Por otra parte la materia prima a partir de la cual se obtuvo la ficocianina también presenta bajo costo y no es necesario un procesamiento complejo para su extracción. A partir de este proceso se obtuvo un índice de pureza de 1.57 como promedio de las últimas etapas de la purificación (intercambio iónico y ultrafiltración), grado de pureza apto para la industria alimentaria. La verificación de la pureza fue exitosa, en la misma se logró identificar la presencia de la ficocianina como también la presencia de aloficocianina por el peso molecular de las subunidades que la conforman, también se identificó la presencia de proteínas contaminantes relacionadas con las bandas **a**, **b** y **d** de la electroforesis desnaturizante.

El perfil de desnaturalización presentó dos transiciones claras a 2.60 M y 6.12 M de urea, estas transiciones se corresponden con la disociación del trímero al monómero y de este último a las subunidades que lo conforman, respectivamente.

A partir del método de extrapolación lineal se logró estimar la energía de Gibbs en ausencia de agente desnaturizante, para ambos procesos de disociación y desnaturalización observados, para la primera disociación 17.16 kJ/mol y para la segunda disociación y posterior desnaturalización de las subunidades α y β 10.19 kJ/mol.

Por último combinando los métodos de fraccionamiento usados y el estudio de estabilidad termodinámica fue posible estimar cuál fue el confórmero de ficocianina purificado, sin la necesidad de implementar métodos que confirmen el peso molecular del confórmero aislado.

7 REFERENCIAS

1. Zuber, H., Structural of light-harvesting antenna complexes of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae. *Trends Biochem Sci*, 1986. 11: p. 414-419.
2. Blankenship, R.E. and H. Hartman, The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends Biochem Sci*, 1998. 23: p. 94-97.
3. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochemistry* 4ed. 2011.
4. Sproviero, E.M., et al., Computational studies of the O(2)-evolving complex of photosystem II and biomimetic oxomanganese complexes. *Coord Chem Rev*, 2008. 252(3-4): p. 395-415.
5. Yagi, M., et al., Artificial model of photosynthetic oxygen evolving complex: catalytic O₂ production from water by di- μ -oxo manganese dimers supported clay compounds. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1767: p. 660-65.
6. Glazer, A.N., Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J Biol Chem*, 1989. 264-68: p. 1-4.
7. Grossman, A.R., et al., The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev*, 1993. 57: p. 725-49.
8. Kathiravan, A. and R. Renganathan, Photosensitization of colloidal TiO₂ nanoparticles with phycocyanin pigment. *J Colloid Interface Sci*, 2009. 335: p. 196-202.
9. MacColl, R., Cyanobacterial Phycobilisomes. *J Struct Biol*, 1998. 124: p. 311-34.
10. Jiang, T., et al., Crystal Structure of R-Phycocyanin and Possible Energy Transfer Pathways in the Phycobilisome. *Biophys J*, 2001. 81: p. 1171-79.
11. Sun, L., S. Wang, and Z. Qiao, Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J Biotech*, 2006. 121: p. 563-69.
12. Thoren, K., et al., The free energy dissociation of oligomeric structure in phycocyanin is not linear with denaturant. *Biochemistry*, 2006. 45: p. 12050-59.
13. Brown, S.B., J.D. Houghton, and D.L. Vernon, New trends in photobiology biosynthesis of ficobilins. Formation of the chromophore of phytochrome, phycocyanin and phycoerythrin. *J Photochem Photobiol*, 1990. 5: p. 3-23.
14. Sauer, K. and H. Scheer, Excitation transfer of C-phycocyanin. Foster transfer rate and exciton calculations based on new crystal structure data for C-phycocyanins from *Agmenellum quadruplicatum* and *Mastigocladus laminosus*. *Biochim Biophys Acta*, 1988. 936: p. 157-70.
15. Heller, B. and Y. Gindt, A biochemical study of noncovalent forces in proteins using phycocyanin from *Spirulina*. *J Chem Edu*, 2000. 77: p. 1459-59.
16. Gantar, M., et al., Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycocyanin from *Limnospira* sp. strain 37-2-1. *J Biotech*, 2012. 159: p. 21-26.
17. Padyana, A. and S. Ramakumar, Lateral energy transfer model for adjacent light-harvesting antennae rods of C-phycocyanins. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1757: p. 161-65.
18. Glazer, A.N., S. Fang, and D.M. Brown, Spectroscopic properties of C-phycocyanin and of α and β subunits. *J Biol Chem*, 1973. 248: p. 5679- 5685.
19. Fisher, R. and H. Scheer, Dissociating effect of chromophore modifications on C-phycocyanin heterohexamers. *J Photochem Photobiol*, 1992. 15: p. 91-03.

20. Kupka, M. and H. Scheer, Unfolding of C-phycoerythrin followed by loss of non-covalent chromophore-protein interactions. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1777: p. 94-103.
21. Gasteiger, E., et al., ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Appl Phys*, 2003. 31: p. 3784-88.
22. Wang, X.Q., et al., Structure of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* at 2.2 Å resolution: a novel monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2001. 57: p. 784-92.
23. Patil, G., et al., Method to obtain C-phycoerythrin of high purity. *J Chromatogr A*, 2006. 1127: p. 76-81.
24. Patel, A., et al., Purification and characterization of C-phycoerythrin from cyanobacterial species of marine and fresh water habitat. *Prot Express Purif*, 2005. 40: p. 248-55.
25. Yan, S.G., et al., Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoerythrin and allophycoerythrin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *J App Phycol*, 2011. 23: p. 1-6.
26. Soni, B., U. Trivedi, and D. Madamwar, A novel method of a single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycoerythrin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property. *Bioresource Technol*, 2008. 99: p. 188-94.
27. Silveira, S.T., et al., Separation of phycoerythrin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2008. 31: p. 477-82.
28. Silveira, S.T., et al., Optimization of phycoerythrin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technol*, 2007. 98: p. 1629-34.
29. Eriksen, N., Production of phycoerythrin-a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2008. 80: p. 1-14.
30. Chaiklahan, R., et al., Separation and purification of phycoerythrin from *Spirulina* sp. using membrane process. *Bioresource Technol*, 2001. 102: p. 7159-64.
31. Ivanova, K., et al., The biliprotein C-phycoerythrin modulates the early radiation response: A pilot study. *Mutat Res-Genetox En*, 2010. 695: p. 40-45.
32. Subhashini, J., et al., Molecular mechanisms in C-phycoerythrin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochem Pharmacol*, 2004. 68: p. 453-62.
33. Nagaraj, S., et al., Hepatoprotective and antioxidative effects of C-phycoerythrin from *Arthrospira maxima* SAG 25780 in CCl₄-induced hepatic damage rats. *Acad J Cancer Res*, 2011. 4: p. 29-34.
34. Lin, B.Q., X.P. Zhao, and W. Lou, The synergistic effect of two photosynthetic pigments in dye-sensitized mesoporous TiO₂ solar cells. *Dyes Pigm*, 2008. 76: p. 327-31.
35. Chang, H., et al., Dye sensitized solar cell using natural dyes extracted from spinach and ipomoea. *J Alloys Compd*, 2010. p. 606-10.
36. Nazeeruddin, M.K., E. Baranoff, and M. Gratzel, Dye sensitized solar cells: A brief overview. *Sol Energy*, 2011. 85: p. 1172-78.
37. Gratzel, M., Solar energy conversion by dye-sensitized photovoltaic cells. *Inorg Chem*, 2005. 44: p. 6841-6851.
38. Gra, M., Molecular photovoltaics. *Accounts Chem Res*, 2000. 33: p. 269-77.

39. Wongcharee, K., V. Meeyoo, and S. Chavadej, Dye sensitized solar cell using natural dyes extracted from rosella and blue peaflowers. *Sol Energ Mat Sol Cells*, 2007. 91: p. 566-71.
40. Silva, L., et al., Experimental design as a tool of c-phycoyanin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. *J Braz Chem Soc*, 2009. 20: p. 5-12.
41. Costa Moraes, C. and S. Juliano Kalil, Strategy for a purification design using c-phycoyanin extract. *Bioresource Technol*, 2009. 100: p. 5312-17.
42. Burgess, R., Protein precipitation techniques. *Methods Enzymol*, 2009. 463: p. 331-337.
43. Scopes, R.K., Separation by precipitation, in Protein purification, principles and practice. 1994. p. 71-100.
44. Evans, D.R.H., J.K. Romero, and M. Westoby, Concentration of proteins and removal of solutes. *Methodos Enzymol*, 2009. 463: p. 104-07.
45. Jungbauer, A. and R. Hahn, Ion-exchange chromatography. *Methodos Enzymol*, 2009. 463: p. 349-71.
46. Pace, C.N., Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methodos Enzymol*, 1986. 133: p. 266-80.
47. Makhatadze, G.I., Thermodynamics of protein interactions with urea and guanidinium hydrochloride. *J of Physical Chemistry B*, 1999. 103: p. 4781-85.
48. Walters, J., S.L. Milam, and A.C. Clark, Practical approaches to protein folding and assembly: spectroscopy strategies in thermodynamics and kinetics. *Methodos Enzymol*, 2009. 455: p. 1-39.
49. Pace, C.N. and K.L. Shaw, Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. *Proteins*, 2000. 4: p. 1-7.
50. Guang, S., H. Qin, and Q. Zheng, Rayleigh, Mie and Tyndal scatterings of polystyrene microspheres in water: wavelength, size and angle dependences. *Appl Phys*, 2009. 105: p. 1-10.
51. Harris, D.C., Análisis químico cunatitativo. 3^a ed. 1992.
52. Soni, B., et al., Extraction, purification and charaterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*-Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochem*, 2006. 41: p. 2017-23.
53. A. Patel, S.M., R. Pawar, P.K. Ghosh, Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitab. *Protein Expres Purif*, 2005. 40: p. 248-255.
54. Singh, N., A. Parmar, and D. Madamwar, Optimization of medium medium components for increased production of C-phycoyanin from *Phormidium ceylanicum* and its purification by single step process. *Bioresource Technol*, 2009. 100: p. 1663-69.
55. Sarada, R., M.G. Pillai, and G.A. Ravishankar, Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass en phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochem*, 1999. 34: p. 795-01.
56. Abalde, J., et al., Purification and caracterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp IO9201. *Plant Sci*, 1998. 136: p. 109-20.
57. Liao, X., et al., Purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* by single-step ion-exchange chromatography. *Chromatographia* 2011. 73: p. 291-96.

AGRADECIMIENTOS

- A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por la financiación del proyecto “Obtención de ensamblado proteína-nanoestructura de TiO₂ como base para celda fotovoltaica” en el marco de Proyectos de Investigación para Estudiantes Universitarios, 2009, tutora del proyecto Fernanda Cedrá.
- A la Lic. en Artes Plásticas y Visuales Natalia Berruzzi Gerardo por la carátula.
- A la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo (AUGM) por la selección del trabajo “Purificación de la proteína antena ficocianina a partir de *Spirulina máxima* y estudio de la estabilidad termodinámica” en la modalidad “Presentación oral” y póster en las XIX Jornadas de Jóvenes Investigadores, Octubre 2011, Ciudad del Este, Paraguay.