

Desempeño de dos técnicas de rompimiento celular en la caracterización de ficobiliproteínas en la microalga *scenedesmus sp.*

Performance of two techniques the cell breaking in the phycobilins characterization in microalgae *scenedesmus sp.*

José Jovanny Bermúdez-Sierra^{1*}, Mauricio Oliveira-Leite¹, Jane Seliado Reis-Coimbra¹ y Marcio Arêdes-Martins²

Resumen: Las microalgas del genero *Scenedesmus sp.* fueron caracterizadas visualmente con respecto al rompimiento y deformación celular y a los contenidos de ficobiliproteínas (FBPs). Para la liberación de las FBPs, las células provenientes del cultivo líquido fueron sometidas a dos tipos de rompimiento mecánico (homogenización sobre alta presión y sonicación) y posteriormente deshidratadas por liofilización. Las fotomicrografías ópticas revelaron que las células sometidas al tratamiento mecánico de homogenización sobre alta presión presentaron rompimiento celular. Para el caso de las células sometidas a sonicación no se observo dicha ruptura, ya que fueron comparadas con las muestras no tratadas mecánicamente (testigo). Las FBPs presentes en las muestras sometidas a las metodologías de rompimiento mecánico de las células y el testigo fueron cuantificadas. El contenido de FBPs de las muestras sometidas a homogenización presentó el mayor rendimiento frente aquellas tratadas por sonicación y al testigo. En adición, este tipo de rompimiento celular también proporciono la mayor recuperación de FBPs (ficocianina Fc, aloficocianina Afc y ficoeritrina Fe) dentro de los cuales la aloficocianina (Afc) fue detectada en mayor cantidad.

Palabras claves: homogenización, sonicación, pigmentos, ficobilinas, rompimiento celular.

Abstract: Microalgae of the genus *Scenedesmus sp.* were visually characterized with respect to cell deformation and rupture and their contents of phycobiliproteins (FBPs). For the release of FBPs, cells from liquid culture were subjected to two types of mechanical breakdown (high pressure homogenization and sonication) and then dried by lyophilization. Optical micrographs showed that cells subjected to mechanical treatment of high pressure homogenization on cell breakdown presented. For the cells subjected to ultrasonic disruption was not observed, and they were compared with samples mechanically untreated (control).

¹ Departamento de Tecnología de los Alimentos DTA-UFV, Universidad Federal de Viçosa, 36570-000. MG. Brasil.

² Departamento de Ingeniería Agrícola DEA-UFV, Universidad Federal de Viçosa, 36570-000. MG. Brasil.

* jose.sierra@ufv.br

auge, los estudios en biosíntesis y rutas son escasos, principalmente cuando se trata con el metabolismo secundario. La gran diversidad de productos derivados presenta numerosas modificaciones y combinaciones, debidas a las reacciones incluidas en las rutas metabólicas primarias y secundarias (Fig. 1). Sin embargo, con la aparición de herramientas como biología molecular, metabolómica, bioprospección y bioinformática han resuelto algunas incógnitas sobre la síntesis de compuestos de interés. Algunos estudios aplicados a micro-organismos, han revelado el descubrimiento de nuevos compuestos biológicamente activos y esenciales para la nutrición humana (Burja et al. 2001). Recientemente las investigaciones con microalgas han ganado un creciente interés como fuente potencial de compuestos bio-activos (pigmentos, ácidos grasos, carbohidratos, flavonoides, entre otros) en el sector farmacéutico, biomédica y nutracéuticos.

Un grupo de estos compuesto de tipo pigmento se encuentran las ficobiliproteínas que son macromoléculas encargadas de la captación de la luz en organismos vegetales como las microalgas especialmente de las cianobacterias (Viskari & Colyer 2003). Estos poseen colores intensos y atractivos, permitiendo un elevado potencial de utilización como colorantes naturales en la industria de los alimentos como aditivos naturales en el proceso de fabricación de bebidas y productos de confitería (gomas y jugos), con acciones antioxidantes, estabilizantes de color (Jespersen et al. 2004), además, mejora las propiedades reológicas (Batista et al. 2006) y prolonga la vida útil del producto. Por lo anterior, la demanda de colorantes naturales viene en aumento, debido que los de origen artificial están asociados cada vez más a problemas de salud, tales como: trastornos de hiperactividad, alergias y déficits de atención (Kobylewski & Jacobson 2010).

Para la obtención de productos a partir de microalgas es necesario desarrollar y complementar diferentes técnicas adecuadas para extraer, cuantificar y conservar metabolitos de origen algal. Los resultados evidenciados en la literatura demuestran claramente que las técnicas utilizadas precisan ser estandarizadas, por presentar para un mismo organismo valores discrepantes. Por ejemplo, en la extracción es clara la necesidad de complementar las técnicas preparativas (extracción con solventes inorgánicos) con las analíticas, especialmente de tipo espectrofotométricas (Moraes et al. 2010; Oliveira et al. 2010), fluorométricas (Patil et al. 2006) y cromatográficas (Zhang & Chen 1999). Otro factor relevante a tener en cuenta es la resistencia de la pared celular al rompimiento y liberación de los componentes de las microalga, por lo tanto es importante tener en cuenta las metodologías para óptimos rendimientos, entre las más empleadas están la deshidratación por liofilización, congelamiento, reducción de tamaño de partícula (Moraes et al. 2010; Wiltshire et al. 2000), ondas de ultra-sonido (Furuki et al. 2003; Wiltshire et al. 2000) y homogenización en alta presión (Patil et al. 2008) que son de tipo mecánico, Igualmente, utilizan técnicas de rompimiento químico adicionando al material enzimas hidrolíticas (Raposo et al. 2001) o reactivos que genere condiciones extremas de salinidad, presión osmótica o pH (ácidos o básicos) (Viskari & Colyer 2003).

La finalidad de este artículo es evaluar el desempeño de dos técnicas mecánicas de rompimiento celular (sonicación y homogeneización en alta presión) en la extracción y caracterización de las ficobiliproteínas en sus formas químicas (ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina) de la microalga *scenedesmus sp.*

2. Materiales y métodos

Los experimentos fueron realizados en los Laboratorios de Operaciones y Procesos (LOP), adscrito al Departamento de Tecnología de Alimentos (DTA) y la Unidad de Crecimiento de Plantas (UCP) del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad Federal de Viçosa UFV, Viçosa – MG, Brasil.

2.1 Obtención de material biológico

La cepa de *Scenedesmus sp.* fue obtenida de la colección de Cianobacterias y microalgas, de la UCP del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad Federal de Viçosa (UFV) en la ciudad de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. La biomasa en forma de cultivo líquido de la microalga fue incubada en medios de cultivo BG11 a 25 °C; con fotoperíodo 16. (luz): 8 (oscuridad) h; con irradiación ($60 \mu\text{mols fotóns} \cdot \text{m}^2\text{s}^{-1}$) por 25 días.

Posteriormente, el cultivo de las microalgas fue sometido a diferentes tratamientos según el diagrama esquemático presentado en Figura 2.

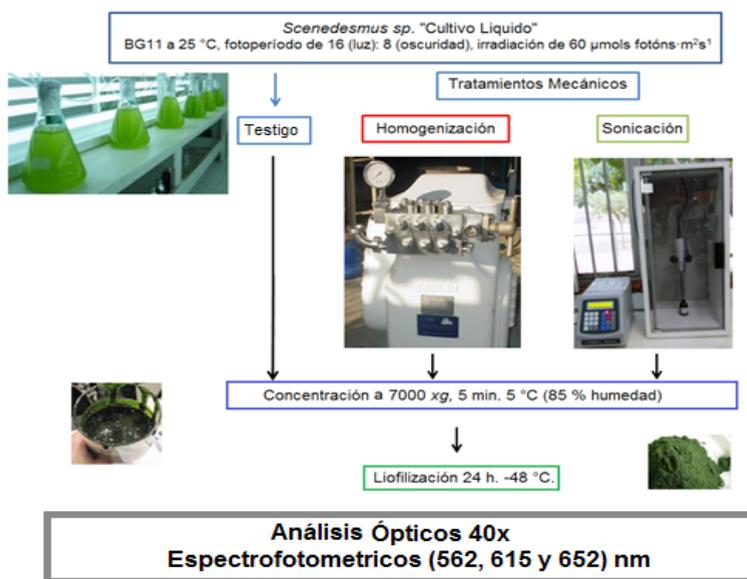


Figura No 2. Diagrama de flujo de la metodología del tratamiento de las muestras

2.2 Método de homogenización sobre alta presión (HSAP)

Un volumen de 10 L de biomasa fue calentado a 65 °C en baño termostático industrial por medio de vapor por circulación en serpentín durante 20 minutos. En seguida, la biomasa fue sometida al tratamiento con alta presión ($300 \pm 2,8$) bar en un homogenizador industrial de Lácteos de la escuela de la FUNARBE/UFV (Viçosa, Brasil) recirculando la muestra durante un período de 5 min (Figura 2).

2.3 Método de Sonicación

Para el volumen de 5 L de cultivo líquido, se ajustó el valor de pH para valores entre 7,5 a 8,0 con HCl o NaOH $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Posteriormente, 250 mL de la muestra líquida fue colocada en el sistema de sonicación por aproximadamente 30 minutos. Los ciclos de trabajo fueron de 5s para sonicación y de 2s de pulsado, con amplitud del 40 % y frecuencia de 40 kHz, a 50 °C (Figura 2).

2.4 Obtención de las Muestras Liofilizadas

El cultivo líquido tratado por los métodos de rompimiento, fue concentrado por centrifugación (Eppendorf 5430, Alemania), re-suspendido en agua desionizada y centrifugado por tres veces más. Luego la muestra concentrada, fue liofilizada (Liofilizador, terroni LS 3000, Brasil), como lo describe la figura No 1.

2.4.1 Análisis Ópticos

Las microalgas liofilizadas no tratadas mecánicamente (testigo) y tratadas, fueron aclimatadas hasta temperatura ambiente, fueron disueltas en agua desionizada (Direct-Q 3 UV, Millipore, EUA) en una relación de 0,1 gr / 5 mL y colocadas en baño de ultrasonido (40 kHz, 15 seg, 25 °C Ultracleaner, Brasil) hasta disolución completa del material liofilizado. Posteriormente fueron observadas al microscopio (Carl Zeiss Primo Star HAL/LED, Alemania) acoplado con un sistema de captura de imagen (ZEN11, Alemania) utilizando el objetivo de 40x.

2.5 Extracción de ficobiliproteínas

Para obtener las ficobiliproteínas (FBPs) ($1,0 \pm 0,05$) g de la microalga liofilizada (tratada o no) fue suspendida en 100 mL de solución buffer fosfato/sodio $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,0 con $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de azida sódica en tubos falcón de 150 mL. La mezcla fue llevada a baño de ultrasonido (40 kHz, 15 min, 50 °C. Ultracleaner, Brasil) y luego a temperatura ambiente. Después se aplicó un proceso de congelación (Ultra-freezer Terroni MFV91, -40 °C, Brasil) y descongelación en ausencia de luz. Este procedimiento fue realizado mínimo por tres veces. Al final, la mezcla totalmente descongelada a temperatura ambiente fue centrifugada ($7000 \times g$ por 30 min. 5804, Eppendorf, Alemania). El sobrenadante con las FBPs fue colectado para la

posterior cuantificación en sus formas químicas (ficocianinas Fc, ficoeritrinas Fe y aloficocianinas Afc) por espectrofotometría.

2.5.1 Determinación de pureza de las Ficobiliproteínas (FBPs)

La medida de las absorbancias en el sobrenadante que contiene las FBPs se realizó en el espectrofotómetro (Cary 50, Varian, Australia). Las lecturas obtenidas a 615, 652, y 562 nm fueron utilizadas para calcular las concentraciones de las FBPs utilizando la ecuación 1 (ficocianinas; Fc), ecuación 2 (aloficocianinas; Afc) y la ecuación 3 (ficoeritrinas; Fe), respectivamente (Bennett & Bogorad 1973).

$$[Fc](mg/L) = \frac{[A_{615} - 0,474(A_{652})]}{5,34} \quad \text{Ec. (1)}$$

$$[Afc](mg/L) = \frac{[A_{652} - 0,208(A_{615})]}{5,09} \quad \text{Ec. (2)}$$

$$[Fe](mg/L) = \frac{[A_{562} - 2,41(PCs) - 0,849(APCs)]}{9,62} \quad \text{Ec. (3)}$$

La relación entre las densidades ópticas de las ficobiliproteínas (Fc, Afc y Fe) en la longitud de onda máxima a 280 nm, fue calculada según las ecuaciones 4, 5 y 6 (Abalde. 1998), determinando las concentraciones puras del pigmento presente en la solución.

$$Fc = \frac{OD_{615}}{OD_{280}} \quad \text{Ec. (4)}$$

$$Fe = \frac{OD_{562}}{OD_{280}} \quad \text{Ec. (5)}$$

$$Afc = \frac{OD_{652}}{OD_{280}} \quad \text{Ec. (6)}$$

El rendimiento (REN) en la extracción para cada una de las ficobiliproteínas fue calculada usando a Ecuación 7 (Silveira et al. 2007):

$$REN (\%) = \frac{[FBP] \times vol}{BS} \quad \text{Ec. (7)}$$

En que, FBP es la concentración de cada una de las ficobiliproteínas (mg·mL⁻¹), Vol= volumen del solvente (mL) y BS = biomasa seca (g).

2.6 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los tratamientos en la extracción de las FBPs (Fc, Fe y Afc) el experimento fue desarrollado con tres repeticiones. Los datos obtenidos en los experimentos fueron interpretados por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) por medio de una prueba de comparación de medias por Tukey al nivel de 5% de

probabilidad (95 % de confianza). Los resultados fueron tabulados en el programa SAS® (2002) licenciado por Universidad Federal de Viçosa.

3. Resultados y discusión

Las técnicas mecánicas de homogenización sobre alta presión (HSAP) y sonicación (SNC) en las condiciones de trabajo evaluadas en el presente estudio, fueron usadas en el rompimiento celular en muestras liofilizadas de la microalga *Scenedesmus* sp. para la extracción de FBPs.

Como lo indica la Figura No 3 (homogenizado), se observaron daños sobre la pared celular y deformaciones en las células con presencia de fragmentos celulares en el medio después de ser sometidas al tratamiento mecánico por HSAP. Este comportamiento indica la eficacia de rompimiento de la pared celular de las microalgas cuando sus células son sometidas a HSAP. En cuanto el resultado para las muestras sonicadas no se evidencio visualmente rompimiento celular, por no presentar diferencias entre las formas celulares frente al testigo. Según Godinho et al. (2010) esta especie presenta formas celulares de característica cóncava y fusiforme, como lo representa la micrografía del testigo (no tratada mecánicamente) en la Figura 3.

En resumen, se puede afirmar que la HSAP es un método mecánico de rompimiento celular que impulsa la suspensión celular a una presión elevada. El cultivo celular es forzado a pasar a través de un orificio estrecho de una válvula que es lanzada desde una cámara de baja presión. La ruptura acontece por el choque y la alta presión de ida y vuelta del chorro celular que recorre desde la válvula hasta la cámara (Lee, Lewis, & Ashman 2012).

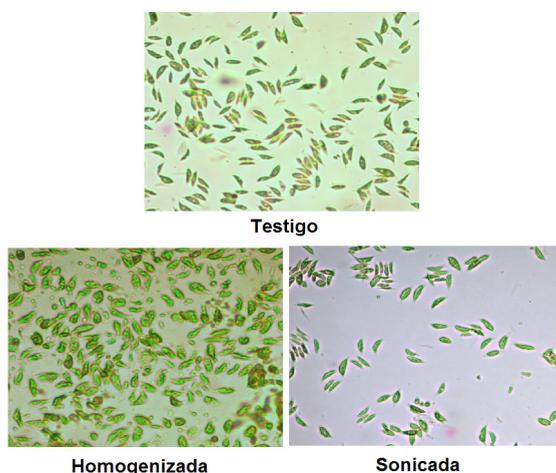


Figura No 3. Micrografías de células de *Scenedesmus* sp. sometidas y no, a los tratamientos mecánicos de rompimiento celular.

La aplicación de la HSAP como técnica mecánica de rompimiento celular en microorganismos celulares son de gran interés industrial, por posibilitar la obtención y el uso de metabolitos de alto valor agregado, como ficocianinas, especialmente en cianobacterias (Batista et al. 2006). Como ejemplo, se observa el caso de la cianobacteria *Spirulina Platensis*. cuyo rompimiento sobre altas presiones (690 - 828 bar) llevo a eficiencias mayores del 42 % en la recuperación de Fc (Song et al. 2013). Safi et., al (2014) determino que la HSAP, en comparación con otras técnicas mecánicas y químicas (ultrasonido, molienda manual, químicas), fue la metodología que evidencio la mayor eficacia en el rompimiento celular y recuperación de sustancias proteicas en diferentes especies de microalgas.

Para el caso de la sonicación que es una técnica basada en la conversión de energía eléctrica a mecánica por medio de ondas sonoras pulsadas con frecuencias entre (20 a 40) kHz, genera en la célula una compresión y descompresión rápida con oscilaciones inestables. Los daños en la estructura de la pared celular son ocasionados por medio de perforaciones internas y/o externas (Zheng et al. 2011). Así mismo, la sonicación es considerada por algunos investigadores una técnica complementaria para liberación y disposición de metabolitos a partir de micro-organismos (Viswanathan et al. 2012; Halim et al. 2012; Balasundaram & Pandit 2001). Sin embargo, para este estudio la técnica de SNC, no presento resultados óptimos en comparación con la HSAP.

La Figura No 4, ilustra los contenidos de las tres formas químicas de las FBPs; ficocianina (Fc), aloficocianina (Afc) y ficoeritrina (Fe), detectadas por espectrofotometría UV/Vis en las muestras liofilizadas tratadas o no mecánicamente. Inicialmente se observo la influencia de los métodos mecánicos de rompimiento celular con diferencia significativa para los contenidos de Afc en las tres muestras. Presentando igualmente, para las muestras homogeneizadas los mayores valores para las FBPs. En cuanto a los contenidos de Fc y Fe no presentaron diferencia significativa entre los tratamientos mecánicos. Además la HSAP y la SNC puede ser una de las opciones alternativas como técnicas mecánicas de rompimiento celular (Abalde. 1998; Furuki et al. 2003; Patil et al. 2006; Patil & Raghavarao 2007; Lawrenz et al. 2010) para aumentar los rendimientos de recuperación de FCBs en células de diversas especies de microalgas, utilizadas especialmente para la extracción de Afc.

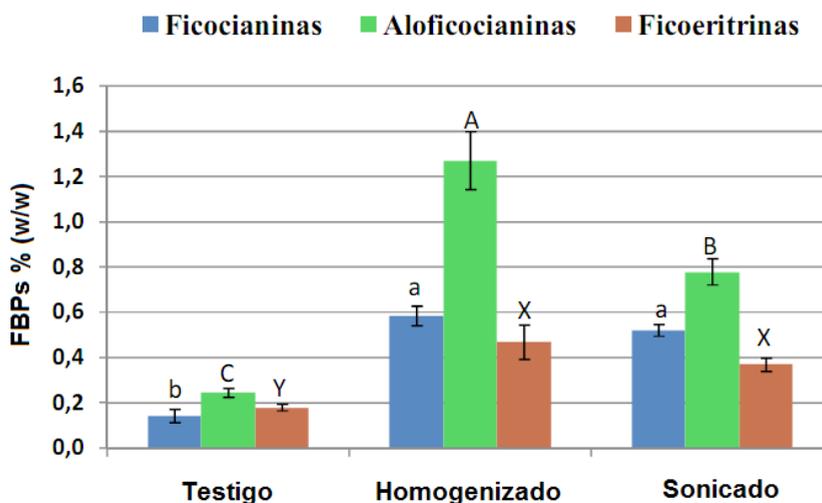


Figura 4. Contenido porcentual de ficobiliproteínas (Ficocianina, Aloficocianina y Ficoeritrina) después del rompimiento mecánico de células de *Scenedesmus* sp. las medias seguidas por las diferentes letras (color de las barras) difieren entre sí, según la prueba de Tukey al 5%.

Las muestras tratadas por HSAP presentaron diferencia significativa en el contenido de aloficocianina (1,27) % en comparación con las tratadas por SNC (0,78) % y las no tratadas mecánicamente el testigo (0,24) %. El contenido de Fc y de Fe de las muestras homogeneizadas (0,58 de Fc; 0,47 de Fe) % y sonicadas (0,52 de Fc; 0,37 de Fe) % no presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$), pero estas evidenciaron diferencia cuando fueron comparadas frente al testigo (0,14 de Fc; 0,18 de Fe) %.

Los contenidos de FBPs en los extractos crudos tratadas o no mecánicamente, encontrados en este estudio fueron inferiores a los valores promedios, en base seca de (20 a 28) % mencionados por Mishra et. al (2008) para Cianobacterias (algas verde-azules) y algas rojas (*Rhodophytas*). Generalmente, la presencia de estos pigmentos en estas especies de microalgas tienen como función exclusivamente la recolección de luz por medio de ensamblajes en conjuntos regulares en la superficie exterior de la membrana tilacoidal (Sekar & Chandramohan 2007). Igualmente se expresan como complejos de proteínas-pigmentos en algas rojas y verdes-azules, según Mostafa (2012) para algas verdes estos tipos de complejos no están presentes en algas verdes. Por lo anterior, Tomitani et al.(1999)concluyeron que la no presencia de las FBPs en algas verdes (*Chlorophyceae*) se debe principalmente por una amplia distancia evolutiva y filogenética que existe con las cianobacterias, especialmente por la presencia de los genes de la clorofila b y ficobiliproteínas.

El número de investigaciones disponibles en la literatura sobre las FBPs en microalgas de la familia *Chlorophyceae* son escasas. Simis & Kauko (2012) determinaron los contenidos de ficobilipigmentos (Fc, Afc y Fe) por técnicas espectrofotométricas cuantitativamente en diferentes especies de Cianobacterias, algas rojas (*Rhodophytas*) y verdes (*Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*) encontrando resultados positivos para las dos primeras y negativos para las segundas respectivamente.

Moraes et al. (2010) encontraron que las Fc están presentes en mayor porcentaje en comparación con las Fe y Afc en Cianobacterias (*Spirulina platensis*); Bermejo et al. (2007) determinaron que las Fe fueron unas de las FCBs extraídas en mayor cantidad en algas rojas (*Porphyridium cruentum*) utilizando cromatografía de absorción en lecho expandido; y Su et al. (2009) encontraron bajos contenidos de Afc en especies de microalgas verde-azules y rojas comparadas frente a los contenidos de Fc y Fe. Al determinar los porcentajes de FBPs por la metodología de Bennet & Bogorad (1973) en las muestras de *Scenedesmus* sp. tratadas mecánicamente (homogeneización y sonicación) y no tratadas (testigo), estas evidenciaron diferencia estadísticamente significativa por la prueba de Tukey ($p < 0,05$), representando el mayor contenido de FCBs en los extractos crudos en las muestras de *Scenedesmus* sp.

El rompimiento celular en las muestras liofilizadas de *Scenedesmus* sp. por homogeneización reporta la mayor cantidad de FBPs (Afc + Fc + Fe) (2,32 %) en comparación con los tratamiento de sonicación (1,67) % y el testigo (0,56) %. Estos resultados confirman la superioridad de los métodos mecánicos en el rompimiento y disponibilidad de los metabolitos intracelulares, especialmente cuando es empleada la HSAP con posible favorecimiento en mayor grado de extracción para las Afc y en menor para las Fc y Fe.

En la Figura No 5, se observa que la muestra no tratada mecánicamente (Testigo) presenta coloración transparente evidenciando una baja eficacia de extracción de FBPs. En cuanto para las muestras sometidas a los tratamientos mecánicos fue posible verificar por inspección visual una mayor extracción de las FBPs.

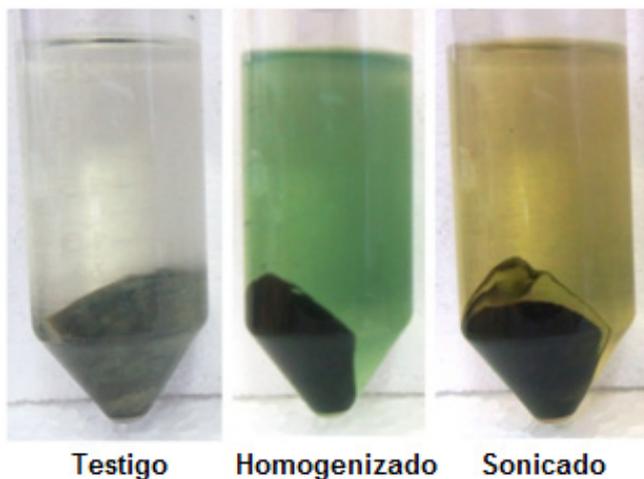


Figura No 5. Comparación visual de los sistemas de extracción de las ficobiliproteínas en función con las técnicas de rompimiento mecánico para *Scenedesmus* sp.

Probablemente, el empleo de la técnica usual para la extracción de FBPs en Cianobacterias citada por Bennet & Bogorad 1973 (Silveira et al. 2007; Simis & Kauko 2012; Moraes, De Medeiros Burkert, & Kalil 2010; Bermejo, Ruiz, & Acien 2007; Su et al. 2009) no presenta eficacia para el rompimiento celular. Esta técnica consiste en colocar mínimo en tres ciclos de congelamiento ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) y descongelamiento las células en el sistema de extracción. Moraes et al. (2010) perfeccionaron el método para la extracción de Fc incluyendo una técnica mecánica (molino de bolas) de rompimiento al procedimiento habitual en Cianobacterias. Estos autores consiguieron recuperaciones por encima al 25 % de Fc. Lo que demuestra que para aumentar los rendimientos de extracción de las FBPs es necesario aplicar técnica de rompimiento celular preliminares a la extracción (buffer fosfato) para así, liberar los metabolitos de interés.

4. Conclusiones

En los tratamientos mecánicos de rompimiento celular aplicados para la microalga, la metodología de HSAP fue más efectiva que el método de sonicación, este comportamiento fue evidenciado por el mayor número de células deformadas y presencia de fragmentos celulares después de ser aplicada la HSAP. De las tres formas químicas de las ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina), la aloficocianina evidencio los mayores contenidos de extracción en los extractos. Por último, se evidencio que la utilización de técnicas de rompimiento preliminares a la extracción con solventes, aumenta sinérgicamente la recuperación de metabolitos intracelulares de interés.

Agradecimientos

Al Grupo de Coímbra Universidades Brasileiras GCUB y la Organización de Estados Americanos OEA. Igualmente, al Laboratorio de operaciones y procesos del Departamento de Tecnología de Alimentos (DTA) y al Laboratorio de Mecánica dos Fluidos Funcionales (CFD/Bio) del Departamento de Ingeniería Agrícola (DEA) de la Universidad Federal de Viçosa UFV. Viçosa, MG, Brasil.

Referencias bibliograficas

- Abalde., J., 1998. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp . 109201. *Plant Science*, 136, pp.109–120.
- Balasundaram, B. & Pandit, a. B., 2001. Selective release of invertase by hydrodynamic cavitation. *Biochemical Engineering Journal*, 8(3), pp.251–256. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X01001140>.
- Batista, A.P. et al., 2006. Rheological characterization of coloured oil-in-water food emulsions with lutein and phycocyanin added to the oil and aqueous phases. *Food Hydrocolloids*, 20(1), pp.44–52. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X05000457> [Accessed June 25, 2013].
- Bennett, a & Bogorad, L., 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of cell biology*, 58(2), pp.419–35. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2109051&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bermejo, R., Ruiz, E. & Acien, F.G., 2007. Recovery of B-phycoerythrin using expanded bed adsorption chromatography: Scale-up of the process. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), pp.927–933. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022906003930> [Accessed May 28, 2013].
- Burja, A.M. et al., 2001. Marine cyanobacteria prolific source of natural products. *Tetrahedron*, 57(590), pp.9347–9377.
- Cardozo, K.H.M. et al., 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 146(1-2), pp.60–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901759> [Accessed March 21, 2014].
- Furuki, T. et al., 2003. Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. *Journal of Applied Phycology*, (15), pp.319–324.

- Godinho, L.R. et al., 2010. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Pablo, Sp. Algas 30:Chlorophyceae (Família Scenedesmus). *Hoehnea*, 37(3), pp.513–553.
- Halim, R. et al., 2012. Microalgal cell disruption for biofuel development. *Applied Energy*, 91(1), pp.116–121. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261911005587> [Accessed June 4, 2013].
- Jespersen, L. et al., 2004. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology*, 220(3-4), pp.261–266. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-004-1062-7> [Accessed June 25, 2013].
- Kobylewski, S. & Jacobson, M.F., 2010. *Food Dyes A Rainbow of Risks*, Washington, DC. Available at: <http://cspinet.org/new/pdf/food-dyes-rainbow-of-risks.pdf>.
- Lee, A.K., Lewis, D.M. & Ashman, P.J., 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy*, 46, pp.89–101. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953412002760> [Accessed June 18, 2013].
- Mishra, S.K., Shrivastav, A. & Mishra, S., 2008. Effect of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*, 43(4), pp.339–345. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511307003455> [Accessed July 4, 2013].
- Moraes, C.C., De Medeiros Burkert, J.F. & Kalil, S.J., 2010. C-Phycocyanin Extraction Process for Large-Scale Use. *Journal of Food Biochemistry*, 34(53), pp.133–148. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4514.2009.00317.x> [Accessed June 24, 2013].
- Mostafa, S.S.M., 2012. Microalgal Biotechnology : Prospects and Applications. In INTECH, ed. *Plant Science*. Giza, Egypt., p. 40. Available at: http://cdn.intechopen.com/pdfs/41642/InTech-Microalgal_biotechnology_prospects_and_applications.pdf.
- Oliveira, E.G. et al., 2010. Optimisation of *Spirulina platensis* convective drying: evaluation of phycocyanin loss and lipid oxidation. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(8), pp.1572–1578. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2010.02299.x> [Accessed July 9, 2013].
- Patil, G. et al., 2008. Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresource technology*, 99(15), pp.7393–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18295479> [Accessed June 20, 2013].

- Patil, G. et al., 2006. Method to obtain C-phycoyanin of high purity. *Journal of chromatography. A*, 1127(1-2), pp.76–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16782107> [Accessed May 29, 2013].
- Patil, G. & Raghavarao, K.S.M.S., 2007. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoyanin. *Biochemical Engineering Journal*, 34(2), pp.156–164. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X06003652> [Accessed July 4, 2013].
- Plaza, M., Cifuentes, A. & Ibáñez, E., 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), pp.31–39. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224407002312> [Accessed March 24, 2014].
- Puglisi, M.P. et al., 2004. Capisterones A and B from the tropical green alga *Penicillus capitatus*: unexpected anti-fungal defenses targeting the marine pathogen *Lindra thalassiae*. *Tetrahedron*, 60(33), pp.7035–7039. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402004008191> [Accessed March 24, 2014].
- Raposo, M.F.J. et al., 2001. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis* : effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *Journal of Applied Phycology*, 13, pp.19–24.
- Safi, C. et al., 2014. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 3, pp.61–65. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926413001227> [Accessed May 1, 2014].
- SAS®, 2002. Statistical Analysis System. , p.15.
- Sekar, S. & Chandramohan, M., 2007. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20(2), pp.113–136. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-007-9188-1> [Accessed April 4, 2014].
- Silveira, S.T. et al., 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource technology*, 98(8), pp.1629–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16962771> [Accessed June 24, 2013].
- Simis, S.G.H. & Kauko, H.M., 2012. In vivo mass-specific absorption spectra of phycobilipigments through selective bleaching. *American Society of Limnology and Oceanography*, 1(2), pp.214–226.

- Song, W., Zhao, C. & Wang, S., 2013. A Large-Scale Preparation Method of High Purity. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(4).
- Su, H.-N. et al., 2009. Efficient separation and purification of allophycocyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 22(1), pp.65–70. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-009-9427-8> [Accessed July 4, 2013].
- Tomitani, A. et al., 1999. Chlorophyll b and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts. *Nature*, 400(6740), pp.159–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10408441>.
- Viskari, P.J. & Colyer, C.L., 2003. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analytical Biochemistry*, 319(2), pp.263–271. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326970300294X> [Accessed June 20, 2013].
- Viswanathan, T. et al., 2012. Effect of cell rupturing methods on the drying characteristics and lipid compositions of microalgae. *Bioresource technology*, 126, pp.131–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23073099> [Accessed May 22, 2013].
- Wiltshire, K.H. et al., 2000. Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Aquatic Ecology*, 34, pp.119–126.
- Zhang, Y. & Chen, F., 1999. A simple method for efficient separation and purification of c-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. , pp.601–603.
- Zheng, H. et al., 2011. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164(7), pp.1215–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21347653> [Accessed June 4, 2013].

Referencia	Fecha de recepción	Fecha de aprobación
José Jovanny Bermúdez-Sierra, Mauricio Oliveira-Leite, Jane Seliado Reis-Coimbra y Marcio Arêdes-Martins. Desempeño de dos técnicas de rompimiento celular en la caracterización de ficobiliproteínas en la microalga <i>scenedesmus</i> sp . Revista Tumbaga (2013), 8 vol. II, 65-79	Día/mes/año 19/04/2013	Día/mes/año 01/08/2013