

## Caracterización de ficocianinas por resonancia magnética nuclear Characterization of phycocyanins by nuclear magnetic resonance

E. Rodríguez-Beltrán<sup>a</sup> , F. J. Martínez-Valdez<sup>a</sup> , J. M. Castillo-Minjarez<sup>a</sup> , R. J. Estrada-Martínez<sup>a</sup> 

<sup>a</sup> Universidad Tecnológica de Tecámac, 55740, Tecámac, Edo. Méx, México.

### Resumen

La C-ficocianina es una ficobiliproteína soluble en agua que funciona como pigmento fotosintético y se encuentra presente en las algas verde-azules. Las C-ficocianinas han sido utilizadas como biomarcadores por sus propiedades fluorescentes y por sus propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras. Existe una necesidad de desarrollar metodologías de extracción, purificación y de conservación eficientes para su uso en el sector industrial. El enfoque de espectroscopia de RMN presentado se revela como una herramienta valiosa para evaluar el nivel de compuestos de bajo peso molecular como las C-ficocianinas.

### Palabras clave:

Ficobiliproteína, C-ficocianina, Resonancia magnética nuclear.

### Abstract

C-phycocyanin is a water-soluble phycobiliprotein that functions as a photosynthetic pigment and is present in blue-green algae. C-phycocyanins have been used as biomarkers for their fluorescent properties and for their antioxidant and immunomodulatory properties. There is a need to develop efficient extraction, purification and conservation methodologies for their use in the industrial sector. The presented NMR spectroscopy approach proves to be a valuable tool to evaluate the level of low molecular weight compounds such as C-phycocyanins.

### Keywords:

Phycobiliproteins, Phycocyanin, Nuclear magnetic resonance.

### 1. Introducción

La C-ficocianina es una ficobiliproteína soluble en agua que funciona como pigmento fotosintético y se encuentra presente en las algas verde-azules. Las C-ficocianinas que se extraen de las cianobacterias, tales como la *Spirulina plantesis*, son los principales pigmentos accesorios de la fotosíntesis en las cianobacterias. Se encuentran en asociación con la superficie exterior de las láminas fotosintéticas y forman parte del aparato de captación de luz del fotosistema II de luz (Patel, A. y col., 2005). Las C-ficocianinas están formadas por dos cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$  de pesos moleculares de 17.6 KDa y 18.1 KDa, respectivamente (William V. P. y col., 1978) y unidas por interacciones no covalentes. También, presenta la absorción máxima a una longitud de onda de 620 nm (Padyana A. K. y col., 2001) y tiene unidos tres cromóforos ficocianobilina, mediante enlace tioéter a cisteínas específicas. Las C-

ficocianinas han sido utilizadas como biomarcadores por sus propiedades fluorescentes (Bhat V. B. y col., 2000) y por sus propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras (Pentón G. y col., 2011; Ou Y. y col., 2010). Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar metodologías de extracción, purificación y de conservación eficientes para su uso en el sector industrial (Llopiz A. y col., 2016). Entre las estrategias empleadas para la purificación de este pigmento tetrapirrólico se encuentra la extracción de las proteínas y posterior ruptura del enlace tioéter, mediante el que están unidas las cadenas polipeptídicas. Posteriormente, se lleva a cabo el proceso de extracción con un solvente orgánico y la purificación basada en la cromatografía en placa, Bach o columna (Llopiz A. y col., 2016). La caracterización de esta molécula implica métodos cromatográficos, espectroscópicos y la determinación de la actividad antioxidante (Llopiz A. y col., 2016). La resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las herramientas más

\*Autor para la correspondencia: [fmartinezv@utecamac.edu.mx](mailto:fmartinezv@utecamac.edu.mx)

Correo electrónico: [restefany394@gmail.com](mailto:restefany394@gmail.com) (Estefany Rodríguez-Beltrán); [fmartinezv@utecamac.edu.mx](mailto:fmartinezv@utecamac.edu.mx) (Francisco Javier Martínez-Valdez); [jomiangel@hotmail.com](mailto:jomiangel@hotmail.com) (José Miguel Castillo-Minjarez), [restradam@utecamac.edu.mx](mailto:restradam@utecamac.edu.mx) (Raziel Jesús Estrada-Martínez).

poderosas que existen en la actualidad para dilucidar estructuras moleculares, principalmente moléculas orgánicas. Esta técnica de análisis, se basa en una característica intrínseca de los núcleos: sus propiedades magnéticas. La mayoría de los núcleos atómicos poseen espín, la cual es una propiedad de las partículas que componen a los átomos. Al momento de introducir átomos con espín nuclear a un campo magnético externo, el núcleo se comporta como un pequeño imán y tiende a orientarse, preferentemente, a favor del campo magnético. Si se aplica energía que obligue a los núcleos a invertir el sentido de su orientación con respecto al campo magnético, se dice que el sistema está en resonancia. A este fenómeno de excitación de los espines nucleares se la conoce como resonancia magnética nuclear (Laurella Sergio, 2017). La espectroscopia mediante resonancia magnética nuclear de proteínas (usualmente llamada RMN de proteínas) es un campo de la biología estructural en el cual se utiliza la espectroscopia RMN para obtener información sobre la estructura y dinámica de las proteínas. (Kocak, M. 2019). Por lo tanto, con este trabajo se busca indicar la posibilidad de usar la técnica de RMN para la identificación de la C-ficocianina para su posterior uso a nivel industrial.

## 2. Metodología

### 2.1. Extracción de C-ficocianina

Las C-ficocianinas se obtuvieron a partir de la biomasa húmeda de *Spirulina plantesis*. Se realizó una homogeneización de la biomasa congelada en presencia de tierra de diatomeas en un mortero, a una proporción de 5:1 (g de biomasa: g de tierra diatomácea). Posteriormente, la biomasa se sometió a un proceso de congelación y descongelación en dos intervalos de tiempo 24 y 48 h. En el segundo caso (48 h), el proceso de congelación y descongelación se repitió dos veces, con intervalos de 24 h. El proceso de extracción de la C-Ficocianina se llevó a cabo utilizando un solvente orgánico y otro inorgánico como se describe a continuación. En la extracción con solvente orgánico, la biomasa húmeda se trató con diferentes concentraciones de ácido clorhídrico (2, 4, 6, 8 y 12 M) en la proporción 5:1 (g de biomasa: ml de ácido inorgánico). En el proceso de extracción con solvente inorgánico, la biomasa húmeda se trató con ácido acético (1 M) en la proporción 5:1. Ambos procesos de extracción fueron de 24 h a temperatura ambiente (25 °C). Después del proceso de extracción, a las muestras se les dio un tratamiento con lisozima y posteriormente ultrasónico. A la biomasa se le añadió lisozima en tampón de fosfato de sodio 0.1 mM (pH 7.0) que contenía una solución de EDTA de sodio 100 mM, para dar una concentración final de 100 µg mL<sup>-1</sup>. La biomasa se incubó durante 24 h a temperatura ambiente (Boussiba y Richmond, 1980). En el segundo tratamiento, se añadió biomasa a un baño ultrasónico (50 kHz), con perlas de vidrio en una proporción de 1:1 (g de biomasa: g perlas de vidrio) durante 40 min (Medeiros y col., 2008).

### 2.2. Preparación de la muestra de C-ficocianina

Una muestra de 50 g (Base húmeda) de células congeladas se lisó con 250 ml de una solución tampón de fosfato 0.01 M (pH 6.9) mediante la adición de 10 mg de lisozima. Después de 90 min con agitación constante, el material se almacenó a 6 °C hasta su uso. Posteriormente, la suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 15 000 X g en una centrifuga refrigerada Sorvall RC2-B a 6 °C. Los extractos se llevaron a 25% de saturación con una solución de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El precipitado resultante se centrifugó, se lavó con una solución del 25% de saturación de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> el líquido sobrenadante y el lavado combinados se llevaron al 45%

de saturación con una solución de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La ficocianina precipitada se centrifugó y el líquido sobrenadante azul pálido se desechó. El precipitado se lavó con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturado al 45%, se descartó el lavado y el precipitado lavado se disolvió en 100 ml de fosfatos a una concentración de 0.01 M (pH 6.9). A continuación, se repitió la precipitación al 25% y 45% de saturación con una solución de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se realizó una purificación adicional mediante cromatografía en columna (Ecteola-Celulosa), con un volumen de columna de al menos cuatro veces el volumen de la solución proteica concentrada. La solución concentrada de ficocianina se colocó en la columna y se eluyó con tampón de fosfato. Antes de su uso, la proteína precipitada se centrifugó, se disolvió en un volumen mínimo de tampón de fosfato 0.01 M (pH 6.9), y se dializó contra tres cambios de dializado a 6°C. El precipitado final se disolvió en un volumen mínimo de tampón de fosfato 0.01 M (pH 6.9) y se dializó a 6°C realizando mas de tres cambios de la solución tampón (10 veces el volumen de la solución proteica). A continuación, la solución se dializó realizando tres cambios del tampón correspondiente (pH 7.3) para garantizar que todos los protones intercambiables fueran sustituidos por deuterio. El pH de la solución tampón, se calculó añadiendo 0.4 a la lectura obtenida con un medidor de pH con electrodo de vidrio calibrado con un tampón estándar en H<sub>2</sub>O (Rosenberg y col., 1969).

### 2.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de difusión

En el trabajo de la espectroscopia de resonancia magnética de difusión se planteó el siguiente procedimiento. Se registraron los espectros en un instrumento Bruker Avance III de 500-MHz con TopSpin 2.1 equipado con una sonda de triple resonancia TXI y en un instrumento Bruker Avance II de 600-MHz con XWIN-NMR equipado con una criosonda TXI. Luego, se utilizó el programa de pulsos p3919gp para obtener datos de RMN 1D 1 H y el programa de eco estimulado stebpgp1s19 para los espectros 2D DOSY. También, se utilizó el programa stebpgp1s191d y stebpgp1s1d para los espectros 1D DOSY con y sin supresión del disolvente Watergate, respectivamente. Se fijaron anchos espectrales de 40 ppm para facilitar la corrección automática de la línea base. En la diferencia 1D DOSY, D = 100 ms, d = 1 ms, y NS = 1024 fueron los parámetros aplicados rutinariamente con dos espectros recogidos con intensidades de gradiente de GPZ6 = 0% y GPZ6 = 100% (0 y 35 G/cm para los gradientes de forma utilizados en las secuencias de pulsos) que resultan ser óptimos en el equipo de 500 MHz.

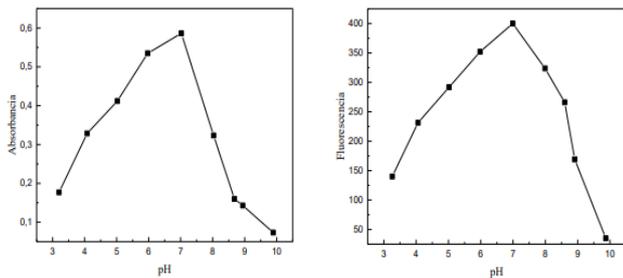
Los dos espectros DOSY 1D con y sin supresión del disolvente Watergate se procesaron, se desfazaron y se corrigieron en la línea base con parámetros idénticos. La fase de distorsión de los picos y línea base sesgada cerca de la señal residual de agua, especialmente en el espectro GPZ6 = 0%, se redujo aplicando un filtro digital a costa de perder la intensidad de algunas señales cercanas a la resonancia del agua. Posteriormente, el espectro del 100% se superpuso al espectro correspondiente del 0%. El espectro del 100% se escaló aproximadamente en un 100% hasta que las señales visibles de las proteínas coincidieron. Luego, se calculó y almacenó la diferencia. Los picos positivos en el espectro de diferencia se asignaron a pequeñas moléculas presentes en la solución de la proteína. Por último, se procesaron los espectros 2D DOSY en las dos dimensiones correspondientes, los desplazamientos químicos (δ, ppm) en abscisas y coeficientes de difusión traslacional (D, m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) en ordenadas, con el módulo DOSY proporcionado con el software XWIN-NMR/TopSpin (Ribeiro y col., 2010).

### 3. Resultados y discusión

Con el proceso de extracción planteado, se observó que al momento de realizar la congelación y la descongelación, así como el baño ultrasónico se provocó la salida del material citoplasmático donde se observa la presencia de ficobiliproteínas, por lo que este procedimiento permitió separar las proteínas en estado natural. La presencia del ion sulfato en el proceso de extracción permitió alcanzar altas fuerzas iónicas, lo que hace que las proteínas sean menos solubles y más estables en dicha solución.

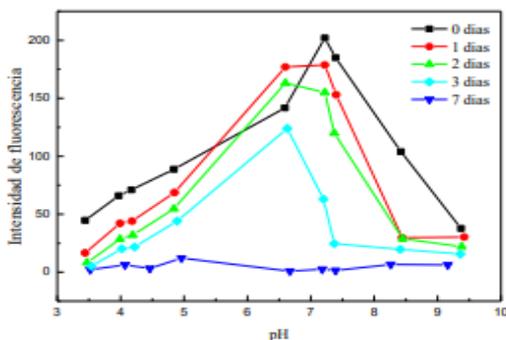
A continuación se presentan los resultados más relevantes en la estabilidad de la C-ficocianina al ir variando el pH de valores de 3 a 10 (Figura 1). En los dos casos se realizaron las medidas en un intervalo de pH de 3 a 10 utilizando los siguientes tampones: tampón de fosfato sódico 0.1 M a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8; tampón TRIS 0.1 M a pH 9; y tampón CHES 0.1 M a pH 10.

La estabilidad de la C-ficocianina depende de la diferencia en el pH por lo que se podría realizar un seguimiento de la variación del color azul de la proteína. En el caso de la fluorescencia se recogería el espectro de emisión a 636 nm tras excitar a 518 nm. Se debe mencionar que el microentorno en el que se encuentra el pigmento determina el máximo de absorción absoluto.

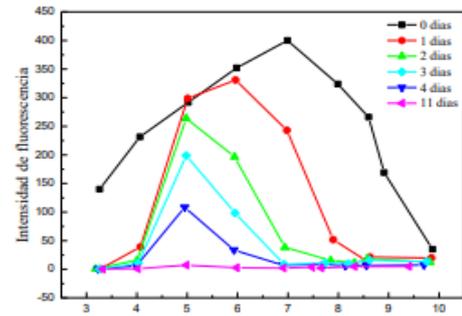


**Figura 1. Efecto del pH en la estabilidad de la C-ficocianina. Medición por espectrometría de absorbancia UV visible (izquierda) y fluorescencia (derecha).**

La C-ficocianina presenta una estabilidad mayor a temperaturas bajas que a temperaturas altas. Cuando la proteína se encuentra a -20 °C (congelada) y 4 °C presenta una gran estabilidad, ya que apenas varían sus propiedades con el paso del tiempo (aproximadamente 168 h); mientras que cuando se encuentra a 25 °C y 37 °C y pasa el mismo tiempo, pierde totalmente su fluorescencia. Lo mismo ocurre en el UV-visible, donde los datos de absorbancia varían de manera análoga a los de intensidad de fluorescencia (Figura 2 y 3).

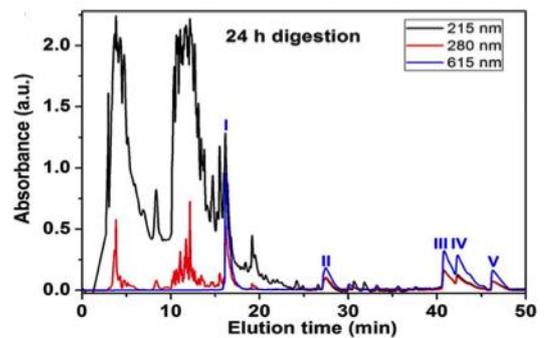


**Figura 2. Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-ficocianina a 25 °C**

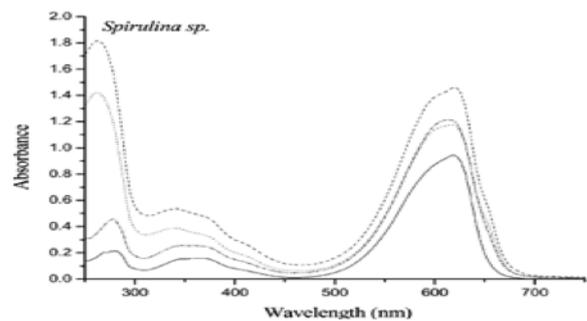


**Figura 3. Variación de la intensidad de fluorescencia de la C-ficocianina a 37 °C**

Las especificaciones para saber el tipo de espectro para la C-ficocianina y el esperado para una proteína dependerán del solvente utilizado, tal como puede ser el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HSO<sub>4</sub> y el saturado (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Por lo que se podría estimar un espectro, teniendo en cuenta la solución y el tipo, es decir si es para proteína diferente en comparación a la C-ficocianina o un espectro tipo estándar (Simeon, L. M. y col., 2016). En todos los resultados se registró un uso casi constante de la precipitación sólida, es decir, por medio de tampones en sulfato sólido. La resuspensión o la suspensión cambian en la electroforesis de las proteínas, ya que los tampones eran para medios diferentes como son la digestión (Figura 4), la purificación y la extracción. Se contó con tampones con sulfatos o fosfatos inorgánicos, para poder observar las absorbancias esperadas (Figura 5), para realizarse los cálculos en peso molecular o las estimaciones estándar. Dicho esto, se presentan los espectros obtenidos para cada caso.

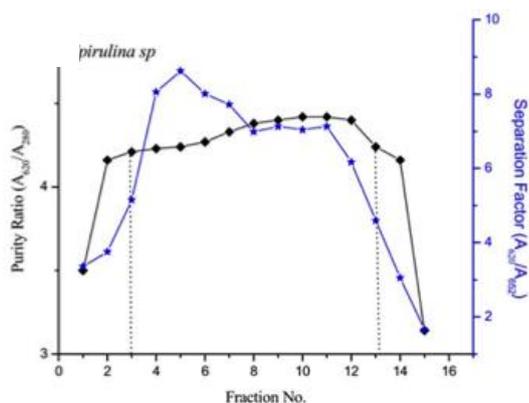


**Figura 4. Condiciones reductoras de la pepsina con dependencia al tiempo de digestión respecto a las C-ficocianinas (Simeon, L. M. y col., 2016).**



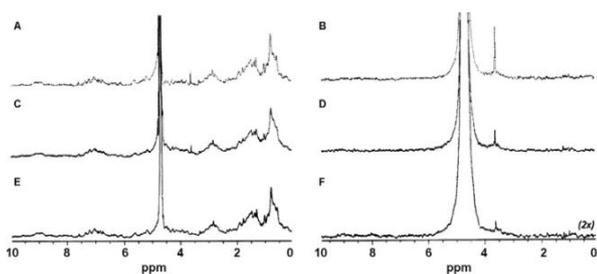
**Figura 5. Espectro de absorción de C-ficocianinas en cada paso de la purificación tras la precipitación fraccionada con sulfato de amonio (Patel, A. y col., 2005).**

En el caso que ocurra una contaminación en cualquiera de los pasos anteriores, se tendrá como resultado un decaimiento en el factor de separación como se observa en la Figura 6.



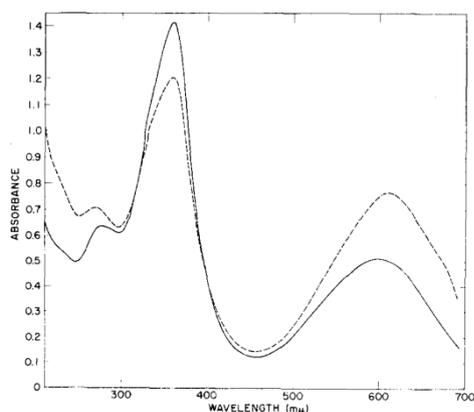
**Figura 6. Fracción con decaimiento en el factor de separación debido a una contaminación mayor en C-ficocianinas (Patel, A. y col., 2005).**

Los registros de los espectros de diferencia 1D DOSY en diferentes condiciones y tras añadirse TRIS se observan en la Figura 7. Los espectros de diferencia 1D DOSY se registraron con la secuencia stbpg1s1d y sin suspensión de disolventes.



**Figura 7. Espectros de diferencia 1D DOSY en diferentes condiciones y tras añadirse TRIS (Ribeiro y col., 2010).**

También se obtuvo el registro del espectro de absorción de la C-ficocianina en fosfato, el cual arrojó los resultados observados en la Figura 8.



**Figura 8. El espectro de absorción de la ficocianobilina en fosfato 0.01 M (Rosenberg y col., 1969).**

## Conclusiones

El enfoque de espectroscopia de RMN presentado se revela como una herramienta valiosa para evaluar el nivel de compuestos de bajo peso molecular en las preparaciones de proteínas a las concentraciones que suelen encontrarse en las fracciones obtenidas por elución durante la cromatografía de afinidad. Esta técnica puede ser correctamente aplicada para la detección de C-ficocianinas con interés industrial. Es necesario profundizar más en este tema para poder identificar campos de desarrollo y la obtención de técnicas novedosas para la identificación de proteínas con gran interés industrial.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo por uso de instalaciones al Centro de Cooperación Academia-Industria del Universidad Tecnológica de Tecámac, en especial al Doctor Genaro Iván Cerón-Montes por su compromiso con la ciencia e investigación en la Universidad tecnológica de Tecámac.

## Referencias

- Bhat, V.B. and Madyastha, K.M. (2000). C-Phycocyanin: A Potent Peroxyl Radical Scavenger in Vivo and in Vitro. *Biochem Biophys Res Comm.* 275, 20-25. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3270>
- Boussiba, S. and Richmond, A. E. (1980). C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 125, 143-147. <https://doi.org/10.1007/BF00403211>
- Laurella, S. L. (2017). *Resonancia magnética nuclear: Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares*. 1 ed. Editorial Universidad de la Plata. ISBN: 978-950-34-1522-1
- Llopiz, A., Milián, A., and Díaz, G. (2016). Purificación y caracterización de la ficocianobilina. *Bionatura.* 1(4), 202-207. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2016.01.04.8>
- Medeiros, F. O., Alves, F. G., Lisboa, C. R., Martins, D. S., Burkert, C. A. V. y Kalil, S. J. (2008). Ondas Ultrasónicas y Pérolas de Vidro: um Novo Método de Extracción de B-Galactosidase para Uso en Laboratorio. *Química Nova*, 31, No. 2, 336. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000200028>
- Kocak, M. (2019). *Resonancia magnética nuclear. Manual MSD*. <https://www.msmanuals.com/es-mx/hogar/temas-especiales/pruebas-de-diagnóstico-por-la-imagen-habituales/resonancia-magnética-nuclear-rmn?query=Resonancia%20magnética> (Consultado Octubre 2021).
- Ou, Y., Zheng, S., Lin, L., Jiang, Q. and Yang, X. (2010). Protective effect of C-phycocyanin against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact.* 185(2), 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.03.013>
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., and Ghosh, P. K. (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein expression and purification.* 40(2), 248-255. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.10.028>

- Padyana, A. K., Bhat, V. B., Madyastha, K. M., Rajashankar, K. R. and Ramakumar, S. (2001). Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycoyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Comm.* 282, 893-898. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4663>
- Pentón, G., Marín, J., Pardo, G., Martínez, G., Acosta, E. F., Valdivia, A. et al. (2011). C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. *Brain Res Bull.* 86(1-2), 42-52. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.05.016>
- Ribeiro, J., Palczewska, M., André, S., Cañada, F. J., Joachim Gabius, H., Jiménez-Barbero, J., Mellström, B., R. Naranjo, J., Scheffers, D.-J., and Groves, P. (2010). Diffusion nuclear magnetic resonance spectroscopy detects substoichiometric concentrations of small molecules in protein samples. *Analytical Biochemistry.* 396, 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.001>
- Rosenberg, R. M., Crespi, H. L. and Katz, J. J. (1969). Nuclear magnetic resonance study of the interaction of sodium dodecyl sulfate with phycocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure.* 175, 31-40. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(69\)90142-1](https://doi.org/10.1016/0005-2795(69)90142-1)
- Simeon, L. M., Stanic-Vucinic, D., Vesic, J., Krstic, M., and Nikolic, M. R. (2016). Digestion by pepsin releases biologically active chromopeptides from Cphycocyanin, a blue-colored biliprotein of microalga *Spirulina*. *Journal of proteomics.* 147, 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.043>
- Williams, V. P. and Glazer, A. N. (1978). Structural studies on phycobiliproteins. I. Bilin-containing peptides of C-phycoyanin. *J Biol Chem.* 253, 202-211.