

Estimación de la vida de anaquel de la ficocianina: Una prueba de vida acelerada

Introducción

Hoy en día existen muchos colorantes como aditivos en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, así como en las investigaciones biomédicas y de diagnóstico clínico (Dasgupta, 2015). Estos pueden ser naturales o sintéticos, siendo los últimos los más utilizados por su precio económico, variedad de colores, solubilidad en agua y estabilidad. Sin embargo, los colorantes sintéticos presentan un alto efecto tóxico, alergénico e incluso carcinógeno, por este motivo, actualmente están siendo reemplazados por colorantes naturales (Antelo, Costa, Kalil, 2008), (González-Ramírez *et al.*, 2014), (Kannaujiya, Sinha, 2016). Por otro lado, actualmente la industria alimentaria está incluyendo un grupo importante de pigmentos naturales en sus productos: las ficobiliproteínas (macromoléculas biológicas), cuya estructura está formada por un complejo de proteína y un grupo cromóforo. Estos pigmentos se pueden encontrar en las cianobacterias, normalmente conocidas como algas verdes azuladas, en los cloroplastos de las algas rojas y en las criptofíceas, una clase de algas unicelulares eucariotas (Bermejo *et al.*, 2003), (Espinoza-Escalante, 2017), (Kannaujiya, Sinha, 2016).

Existen varios tipos de ficobiliproteínas: aloficocianinas, ficoeritrocianinas, ficoeritrinas y ficocianinas (Glazer, 1984). Lo últimos 2 grupos son de interés comercial, debido a sus costos y amplia aplicación, siendo la de mayor relevancia la C-ficocianina. La cual contiene un cromóforo denominado ficocianobilina (PCB), responsable del color azul que es característico de esta proteína. En diversos sectores

industriales se utilizan la ficocianina y la ficoeritrina como colorantes de gomas de mascar, helados, dulces, bebidas, productos lácteos, confitería y cosméticos (Kannaujiya, Sinha, 2016). También, las PCB se han usado como trazadores bioquímicos en inmunoensayo debido a sus propiedades fluorescentes; además, se ha demostrado que tienen propiedades terapéuticas tales como: capacidad anticancerígena, antioxidante y antiinflamatoria, ya que las PCB que contiene la *Spirulina* son potentes atrapadores de radicales libres que inhiben la peroxidación lipídica (Chaiklahan, *et al.*, 2011), (Piñero-Estrada, 2001), (Roman *et al.*, 1998). Sin embargo, las PCB como la mayoría de los pigmentos naturales son poco estables a las condiciones de tratamiento térmico y conservación.

Dada la importancia de la ficocianina en la industria alimentaria y cosmética, y la poca información disponible sobre las condiciones óptimas de almacenaje que permitan conservar los pigmentos naturales en su estado activo, es necesario llevar a cabo pruebas de vida de anaquel, mejor conocidas como pruebas de vida acelerada. Estas pruebas se basan en someter un artículo o producto a condiciones de operación (esfuerzo) más severas que la condición de operación usual con el fin de observar fallas más rápidamente y con esto tener evaluaciones oportunas de la confiabilidad de los materiales, componentes o subsistemas estudiados (Escobar, Meeker, 2006) para entonces predecir la vida útil del pigmento en condiciones de uso regulares o establecer las mejores condiciones de almacenamiento para prolongar la vida de anaquel del producto.

Como se mencionó antes, uno de los factores de mayor impacto en la vida útil de los productos cosméticos y alimentarios es la temperatura, por ello, se ha empleado la relación vida útil-esfuerzo tipo Arrhenius (Ecuación 1) para describir el tiempo de vida que tendrá un producto (Escobar, Meeker, 2006).

Ecuación de Arrhenius:

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (1)$$

E_a es la energía de activación, generalmente viene dada en electrovolts; k es la constante de Boltzman, la cual es 8.6171×10^{-5} electro volts/K; A es una constante característica de falla del producto en condiciones de prueba. R es la constante de los gases, la cual es $8.314 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$; T es la temperatura a la cual la reacción empieza, en K.

Otros trabajos han estudiado la degradación térmica de la ficocianina en solución con la adición de estabilizantes o conservadores (Antelo *et al.*, 2008; Kannaujiya, Sinha, 2016), sin embargo, la metodología utilizada fue la cinética química de degradación de primer orden. En este estudio, en cambio, se evaluó la integridad de una solución de ficocianina utilizando la metodología estadística descrita para vida de anaquel. Las soluciones acuosas de ficocianina fueron sometidas a diferentes regímenes de temperatura extrema con el fin de determinar la combinación tiempo – temperatura de almacenaje en la cual se conserva íntegro el pigmento en solución, lo cual por consiguiente implicaría que conserva las propiedades que lo hacen valioso en la industria alimentaria y cosmética.

Materiales y Métodos

Solución de ficocianina

Para este estudio se obtuvo una solución acuosa de ficocianina de la empresa Biotecnología Mexicana de Microalgas S.A. de C.V.

Determinación de la concentración de ficocianina

La solución madre proporcionada por la empresa se diluyó hasta 10 % y se hicieron diluciones seriadas con decrementos de 1 %. Se midió la DO_{620} de cada una de las soluciones para hacer una curva patrón de comparación de la evolución de degradación.

Pruebas de vida acelerada

Se prepararon 10 alícuotas de solución acuosa de ficocianina al 10 % y se sometieron a una de tres temperaturas: 40, 60 y 80 °C. Con el fin de dar seguimiento a la degradación (% de pigmento residual en solución) se tomaron muestras de solución de cada una de las temperaturas a intervalos de 30 minutos y se leyó su DO_{620} .

Estimación de la degradación de ficocianina

Los datos cinéticos de degradación fueron tratados mediante el software estadístico Statgraphics Centurion XVI y se ajustaron usando la distribución de probabilidad Weibull para obtener el percentil 50 de degradación, es decir, el tiempo al cual se había degradado el 50 % de la ficocianina en la solución acuosa de prueba en cada una de las tres temperaturas probadas. Se estimó la vida de anaquel utilizando la ecuación de Arrhenius antes descrita utilizando el mismo software.

Resultados y discusión

Se observó una rápida degradación de la ficocianina a todas las temperaturas probadas. En todos los casos se estimó el tiempo en el cual la concentración de ficocianina en solución era 5 % (vida media) y 0 % (degradación completa). La vida media del pigmento en solución se estimó en 38.7, 3.64 y 1.80 h para las temperaturas 40, 60 y 80 °C, respectivamente. En ese mismo orden de temperaturas la degradación completa del pigmento en solución se observó a las 2, 4.5 y 9 horas (Fig.1).

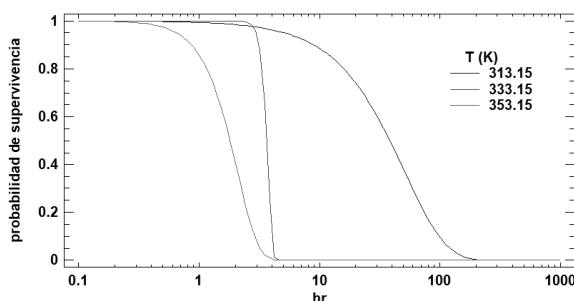


Figura 1. Gráfico de probabilidades de supervivencia (no degradación) de la ficocianina a diferentes temperaturas (K) a través del tiempo.

Una vez obtenidos los tiempos de falla del percentil 50 (vida media) se hizo una estimación de la vida media del pigmento en solución a -20 °C (253.15 K), 4 °C (277.15 K) y 25 °C (298.15 K) utilizando la ecuación de Arrhenius. Es decir, se determinó el tiempo

en el cual se degrada el 50 % del pigmento contenido en una solución acuosa de ficocianina al 10 %. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Estos resultados son congruentes con los reportados previamente por (Moreno García, 2016), quien reporta que la C-Ficocianina es bastante más estable a temperaturas bajas que a temperaturas altas. Cuando esta proteína se encuentra a -20 °C (congelada) y 4 °C presenta una gran estabilidad, ya que esta apenas varía al pasar una semana en almacenamiento; mientras que cuando se encuentra a 25 °C y 37 °C y pasa el mismo tiempo, pierde totalmente su fluorescencia.

Tabla 1. Determinación de la vida media la solución de ficocianina al 10 % en solución acuosa a diferentes temperaturas

Temperatura	Vida media (h)	Vida media (años/días)
-20 °C (253.15 K)	20,064	2.5 años
4 °C (277.15 K)	1,072	45
25 °C (298.15 K)	121.6	5

Por su parte, Kannaujiya y Sinha (2016), estimaron una vida media de la ficocianina en solución buffer de fosfatos (50 mM) de 18 días cuando la solución se almacena a 25 °C y 111 días cuando se almacena a 4 °C. Los resultados son diferentes a los obtenidos en este estudio por dos posibles razones: 1) la solución buffer ejerce un efecto estabilizador en las proteínas y 2) la metodología utilizada para la estimación de la vida media es diferente. Es importante considerar que el estudio aquí presentado utiliza la metodología de las pruebas de vida acelerada estadísticas y la ecuación de Arrhenius, siguiendo un modelo de aceleración empírica Escobar y Meeker (2016), quienes recomiendan este tipo de modelo para ajustar datos experimentales de falla de productos. Por su parte Kannaujiya y Sinha (2016) utilizaron una cinética química exponencial de primer orden, que de acuerdo con Escobar & Meeker (2016) corresponde a un modelo de aceleración fisicoquímico.

Conclusiones

Las pruebas de vida acelerada muestran que la solución acuosa de ficocianina debe almacenarse en refrigeración (4 °C) y de preferencia a temperaturas bajo cero (eg. -20 °C) para prolongar la vida de anaquel del pigmento. Se requieren otros estudios para determinar la vida de anaquel de la actividad antio-

xidante tras el almacenamiento cuando se trabajan soluciones de ficocianina, ya que entre los valores agregados del pigmento se ha reportado su capacidad antioxidante, la cual podría verse afectada por la temperatura.

Bibliografía

- Antelo, F. S., Costa, J. A. V., & Kalil, S. J. (2008). Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*, 41(1), 43–47.
- Bermejo, R., Tobaruela, D. J., Talavera, E. M., Orte, A., & Alvarez-Pez, J. M. (2003). Fluorescent behavior of B-phycoerythrin in microemulsions of aerosol OT/water/isooctane. *Journal of Colloid and Interface Science*, 263(2), 616–624.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S., & Bunnag, B. (2011). Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresource Technology*, 102(14), 7159–7164.
- Dasgupta, C. N. (2015). Algae as a Source of Phycocyanin and Other Industrially Important Pigments. In D. Das (Ed.), *Algal Biorefinery: An Integrated Approach* (pp. 253–276). Cham: Springer International Publishing.
- Escobar, L. A., & Meeker, W. Q. (2006). A Review of Accelerated Test Models. *Statistical Science*, 21(4), 552–577.
- Espinoza Escalante, F. M. (2017). Microalgas en la alimentación. *Ciencia*, 62(2), 1–5.
- González-Ramírez, E., Andújar-Sánchez, M., Ortiz-Salmerón, E., Bacarizo, J., Cuadri, C., Mazzuca-Sobczuk, T., Martínez-Rodríguez, S. (2014). Thermal and pH Stability of the B-Phycoerythrin from the Red Algae *Porphyridium cruentum*. *Food Biophysics*, 9(2), 184–192.
- Kannaujiya, V. K., & Sinha, R. P. (2016). Thermokinetic stability of phycocyanin and phycoerythrin in food-grade preservatives. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 1063–1070.
- Moreno García, L. del C. (2016). *Estudio de la estabilidad de la C-Ficocianina*. Universidad de Almería.
- Piñero Estrada, J. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco*, 56(5–7), 497–500.

Romay, C., Armesto, J., Ramirez, D., González, R., Ledon, N., & García, I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phyco-cyanin from blue-green algae. *Inflammation Research : Official Journal of the European Histamine Research Society*, 47(1), 36–41.

Froylan Mario Espinosa Escalante
Jessica Amador Cuétara
Yesenia Beltrán Pérez
Alma Georgina Benítez Gurrola
Luz Aurora Ramírez Ronzón
Alexa Torres Soltero

Universidad Autónoma de Guadalajara A.C.

Correspondencia: froymario@edu.uag.mx

Recibido: 07-03-2018 Aceptado: 11-04-2018

(Artículo Arbitrado)