Extracción de biopigmentos derivados de un cultivo en fotobiorreactor tipo batch de *Arthrospira platensis*, Gomont 1892 del Paraguay

Extraction of biopigments derived from a batch photobioreactor culture of *Arthrospira platensis*, Gomont 1892 from Paraguay

DOI: 10.46932/sfjdv3n2-040

Received in: February 15th, 2022
Accepted in: March 1st, 2022

Shaun Patrick McGahan Silva
MSc. in Industrial Biotechnology
Institución: Universidad Nacional de Asunción
Dirección: Campus Universitario - San Lorenzo
Correo electrónico: patrick.slv2@gmail.com

Rebeca María Dejesús Prieto Garcete
Institución: Universidad Nacional de Asunción
Dirección: Campus Universitario - San Lorenzo

Sandra Álvarez Trinidad
Institución: Universidad Nacional de Asunción
Dirección: Campus Universitario - San Lorenzo

RESUMEN
Las cianobacterias, comúnmente llamadas algas verde azules, fueron aprovechadas a lo largo de la historia para diferentes fines. Las mismas pueden ser cultivadas en sistemas abiertos, como también en sistemas cerrados, comúnmente denominados fotobiorreactores, que son aquellos que tienen poco o nulo contacto con la atmósfera. Son varios los productos que pueden ser obtenidos a partir de los cultivos de cianobacterias, como los pigmentos o biopigmentos, los mismos pueden ser extraídos, identificados y cuantificados por distintos métodos, entre los más abundantes, las ficoproteínas, específicamente la ficocianina, es una de las más abundantes, que presentan en su estructura grupos postéticos que son cromóforos. En el presente trabajo se evaluó la extracción de pigmentos a partir de un cultivo de Arthrospira platensis cultivada en Fotobiorreactor tubular tipo airlift. El proceso de extracción contó con varias etapas, entre ellas, centrigugación, congelamiento-descongelamiento y sonicación final para obtener una suspensión de color azul que posteriormente fue analizado por espectrofotometría y cromatografía en capa fina. Los resultados obtenidos mostraron un pico de absorción que fue analizado y contrastado. Por otra parte, la cromatografía en capa fina se realizó con la finalidad de descartar la existencia de otro pigmento en la solución, utilizando diferentes solventes polares. Con los resultados obtenidos se puede concluir que la metodología empleada se presenta como una opción rápida y viable para realizar la extracción de biopigmentos a partir de cultivos de Arthrospira platensis.

Palabras clave: biopigmentos, ficocianina, arthrospira platensis, fotobiorreactor.

ABSTRACT
Cyanobacteria, commonly called blue-green algae, have been used throughout history for different purposes. They can be cultivated in open systems, as well as in closed systems, commonly called photobioreactors, which are those that have little or no contact with the atmosphere. There are several products that can be obtained from cyanobacterial cultures, such as pigments or biopigments, they can be

extracted, identified and quantified by different methods, among the most abundant, phycoproteins, specifically phycocyanobilin, is one of the the most abundant, which present in their structure postthetic groups that are chromophores. In the present work, the extraction of pigments from a culture of Arthrospira platensis cultivated in an airlift-type tubular photobioreactor was evaluated. The extraction process included several stages, including centrifugation, freezing-thawing, and final sonication to obtain a blue-colored suspension that was later analyzed by spectrophotometry and thin-layer chromatography. The results obtained showed an absorption peak that was analyzed and contrastedOn the other hand, thin layer chromatography was performed in order to rule out the existence of another pigment in the solution, using different polar solvents. With the results obtained, it can be concluded that the methodology used is presented as a fast and viable option to carry out the extraction of biopigments from cultures of Arthrospira platensis.

Keywords: biopigments, phycocyanin, arthrospira platensis, photobioreactor.

1 INTRODUCCIÓN

El término microalgas, se aplica a una amplia variedad de microorganismos fotosintéticos, productores de clorofila, y posee un metabolismo análogo al de las plantas. Bajo esta denominación se incluyen organismos con dos tipos de estructura celular: los procariotas, entre ellos, se encuentran las Cyanophytas (cianobacterias) y los eucariotas, como son algunos representantes de este grupo las Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae e Xantophyceae), Cryptophyta e Dinophyta (Derner et al., 2006).

Las cianobacterias, conocidas también con la denominación de algas verde azules, son generalmente un gran grupo heterogéneo de organismos unicelulares, fotoautotróficos oxigénicos que crecen tanto en agua dulce como salada (Rippka et al. 1981; Haney 1987, Van Den Hoek et al., 1995). Los usos que se le han dado son varios, destacándose principalmente su utilidad como alimento para consumo humano y animal (Kovaè et al., 2013), también se utiliza en la biorremediación de ambientes contaminados, principalmente para el tratamiento de aguas residuales (Santos et al., 2012, Wang et al. 2017), como productoras de energía (Harun et al., 2010), como fertilizantes (Venkataraman, 1981), para la reutilización biológica del dióxido de carbono (Brune et al. 2009), y más recientemente, el estudio para determinar metabolitos de microalgas con potencial uso en distintos campos, y su posible aplicación en áreas como la farmacología y cosmética (Nuhu, 2013, Sathasivam et al. 2019).

Las microalgas y cianobacterias pueden ser cultivadas en distintos tipos de fotobiorreactores PBR (por sus siglas en inglés), desde los más complejos, como los sistemas cerrados, a los más simples, como pueden ser los sistemas abiertos. Los PBS en especial, los de tipo airlift, son los más recomendados para procesos que implique el uso de microorganismos sensibles al cizallamiento, debido a que estos sistemas que no implementan la agitación mecánica, cuentan con un sistema de aireación, que genera un movimiento y circulación de burbujas de aire dentro del sistema, garantizando el mezclado de nutrientes

y aire que permitan el buen crecimiento celular (Tovar Salamanca & Ruíz Díaz, 2016). El funcionamiento de los PBS tipo airlift se basa en la formación de un sistema homogéneo gas-líquido-sólido y la circulación del medio dependiendo de la configuración podría realizarse a través de un tubo céntrico (Fernández, 2013).

Una de las razones principales del gran interés que despierta el cultivo de *Arthrospira platensis* (Gomont, 1892), es la facilidad de cultivo, la misma puede ser cultivada en sistemas abiertos, así también la composición cualitativa y cuantitativa de la biomasa. La *A. platensis*, es una excelente fuente de macro y micronutrientes: es rica en proteínas con un máximo de más del 60 % en peso seco (Becker, 2007). También contiene vitaminas, pigmentos, es decir, clorofila (Chl-a), ficobiliproteínas y carotenoides (Cohen 1997), oligoelementos y minerales que le confieren diferentes propiedades biológicas (El-Baky, 2008).

Las cianobacterias, son fuentes de proteínas, polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados como el EPA y DHA, compuestos fenólicos, que le otorga distintas propiedades biológicas (Bari, et al., 2021), también estas algas poseen cantidades significativas de vitaminas del complejo B como la B12, B1, B2 y B6, también biotina y minerales como el Fe, Na, Zn, K, Ca y Mg (Christaki *et al*., 2011).

Entre los metabolitos de interés que pueden ser aprovechados y utilizados, están las ficobiliproteínas, que son proteínas solubles en agua, que funcionan como pigmentos fotosintéticos accesorios en diferentes organismos, tales como: las cianobacterias, las algas rojas y las criptomonadas (Díaz, et al., 2016). La ficocianina es un complejo pigmento-proteína de la familia de las ficobiliproteínas, presente junto con la aloficocianina y la ficoeritrina (Glazer, A, 1989). La ficocianina (C-PC) es un compuesto soluble en agua que se encuentra en las cianobacterias y son parte hasta el 15 % de total de las proteínas de *A. platensis* (Patel, 2005) y esta proteína, la ficocianina, tiene propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias (Safari, 2018).

Existen distintos métodos químicos que podrían implementarse para extraer, identificar y cuantificar los pigmentos de cianobacterias. Las extracciones pueden realizarse con agua, solvente orgánicos como acetona, metanol, etanol, entre otros (Medina-Jaritz et al., 2011; Vonshak, 1997a; Vonshak, 1997b), así también implementando soluciones salinas como, nitrato de sodio, cloruro de calcio y sales de fosfato (Medina-Jaritz et al., 2011; Rodríguez-Sánchez et al., 2012).

En la actualidad, el uso de pigmentos naturales va incrementando, los mismos son empleados como aditivos en fórmulas farmacéuticas y alimentos procesados, como por ejemplo la clorofila, la cual proporciona una actividad quelante que puede utilizarse en tratamientos farmacológicos, especialmente la reparación celular, el aumento de la hemoglobina en la sangre y el aumento del crecimiento celular (Humphrey, 2004).

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MICROORGANISMO

Se utilizó una cepa de *Arthrospira platensis* procedente de la colección de cepas cultivadas en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad Nacional de Asunción, que previamente fue aislada e identificada molecularmente por Villalba *et al*. (2018). El mismo fue cultivado con medio Zarrouk (Zarrouk, 1966) (Tabla 1 y 2), en un PBR tipo airlift con un volumen de cultivo de 2 L, con flujo de aireación de 0.8 vvm, con un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad con una intensidad lumínica de 5600 lm.

Tabla 1. Componentes del medio Zarrouk para 1 L

Nombre	**Contenido (g/L)**
$NaHCO_3$	16,8
K_2HPO	0,5
$NaNO_3$	2,5
K_2SO_4	1
NaCl	1
$MgSO_4$	0,2
$CaCl_2$	0,04
$FeSO_4$	0,01
EDTA	0,08
Solución A5	1mL

Tabla 2. Componentes de la solución A5

Nombre	**Contenido (g/L)**
H_3BO_3	2,86
$MnCl_2.4H_2O$	1,81
$ZnSO_4.\ 7H_2O$	0,22
$Na_2MoO_4.\ 2H_2O$	0,39
$CuSO_2.\ 5H_2O$	0,08

2.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA DE CULTIVO

Para el proceso de ruptura celular, se procedió de la siguiente manera, primeramente se tomó una muestra de cultivo que fueron distribuidos en 6 tubos de ensayo 40mL en cada tubo de ensayo, los mismos fueron centrifugados a 3700 rpm durante 25 min., a fin de evitar la degradación de la muestra, la centrifugación se realizó con una refrigeración de 4 °C. El pellet obtenido posterior a la centrifugación fue resuspendido previa eliminación del sobrenadante, la resuspensión se realizó agreando 5mL de tampón fosfato (PBS) 0.1M, a pH 7.5, se prosiguió a otro centrifugado replicando la mismas condiciones inicialmente descritas, finalmente el sobrenadante fue eliminado, el pellet resultante fue resuspendido nuevamente con 5mL de PBS. La ruptura celular se realizó por proceso de congelamiento/descongelamiento, primeramente se congeló durante 12 hs a 0°C, posterior a eso, se procedió a realizar 4 ciclos de descongelamiento y congelamiento de intervalos de 4 horas cada uno,

finalmente, para garantizar una mayor cantidad de células disgregadas, las mismas fueron sometidas a un proceso de sonicación simple durante 10 minutos, como proceso final, se realizó otra centrifugación, empleando las condiciones iniciales.

2.3 EXTRACCIÓN DE BIOPIGMENTOS

Al final de la ruptura celular, se agregó al pellet 5mL de solución sulfato de amonio (NH4)2SO4 al 30% y se dejó precipitar por dos horas, transcurrido este tiempo, la suspensión fue llevada a centrifugación durante 30 minutos a 11.000rpm, el primer sobrenadante fue recuperado y refrigerado, el mismo presentó una coloración azulada. El segundo pellet generado fue resuspendido con una solución sulfato de amonio (NH4)2SO4 al 60% el cual se dejó precipitando durante dos horas, la suspensión fue llevada a centrifugación durante 30 minutos a 11.000rpm., el sobrenadante obtenido fue recuperado y refrigerado. El pellet resultante de la tercera centrifugación fue resuspendido en dos soluciones, una de ellas con 5mL de PBS 0,1M y con 7,5 de pH, y otra en agua destilada estéril, ambas resuspensiones presentaron una coloración intensa en azul que luego fue analizado por densidad óptica y cromatografía en capa fina (TLC).

2.4 ANÁLISIS EN ESPECTROFOTÓMETRO

Los sobrenadantes obtenidos posterior a la centrifugación con la solución de sulfato de amonio de 30% y 60%, así como las suspensiones de pellet con PBS y agua estéril, fueron analizados por espectrofotometría (espectrofotómetro Thermo Genesys 10S UV-Vis), realizando un barrido entre 200nm y 800nm, de manera a determinar a qué longitud de onda absorben las moléculas obtenidas en ese sobrenadante, y así aproximar el tipo de biopigmento que se obtuvo.

2.5 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

La cromatografía en capa fina se realizó utilizando tres solventes, Diclorometano con polaridad 3.1, Acetato de Etilo con polaridad 4.4, Acetona con polaridad 5.1 y Hexano con polaridad 0.1. Se realizaron diferentes mezclas de estos solventes en las siguientes proporciones:

Mezcla 1: 6 ml de Diclorometano y 4 ml de Acetona

Mezcla 2: 6 ml Acetato de Etilo y 4 ml de Diclorometano

Mezcla 3: 8 ml de Acetato de Etilo y 2 ml de Hexano

La placa de aluminio para la cromatografía en placa fina sirvió como fase estacionaria, la misma fue seccionada con las siguientes dimensiones: 2cmx4cm, en ambos extremos fue delimitada por las líneas para delimitar la zona de desplazamiento, se sembraron 4µL en uno de los extremos de los pigmentos

resuspendidos en PBS y agua destilada estéril. Las placas de aluminio fueron colocadas en vasos de precipitado sobre las mezclas de solventes y luego el resultado fue observado bajo lámpara UV.

3 RESULTADOS

Los sobrenadantes obtenidos posterior a la precipitación con la solución (NH4)2SO4 al 30% y 60 % fue analizado por espectrofotometría (*espectrofotómetro Thermo Genesys 10S UV-Vis*), los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2.

Figura 1. Barrido obtenido del primer sobrenadante recuperado, posterior a la precipitación con la solución al 30%

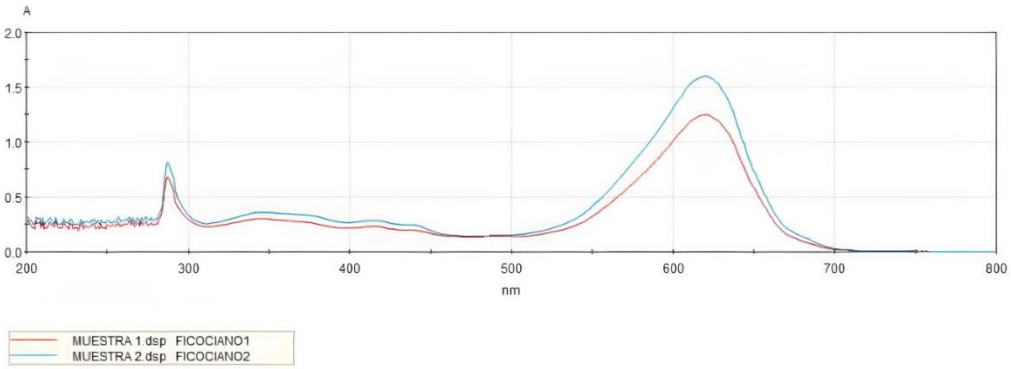
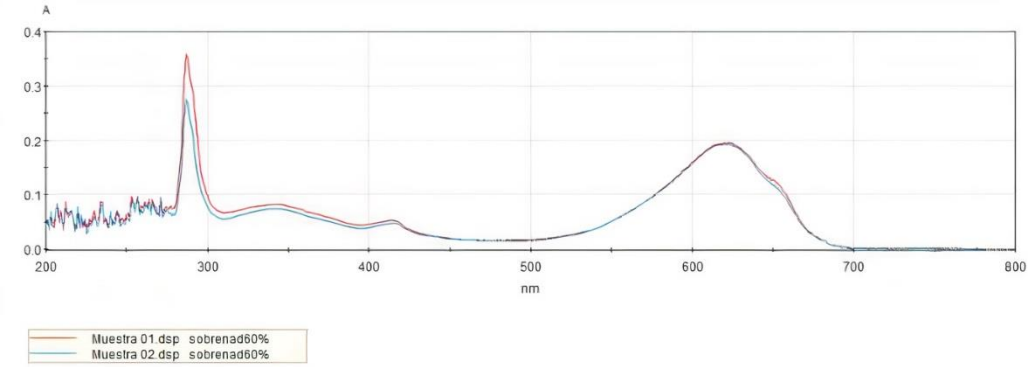


Figura 2. Barrido obtenido del primer sobrenadante recuperado, posterior a la precipitación con la solución al 60%



Se realizó un barrido de ambos sobrenadantes por duplicado, las longitudes de onda comprendidas fueron 200nm y 800nm, esto se realizó para determinar a qué longitud de onda absorben las moléculas obtenidas en ambos sobrenadantes, y así tener una aproximación al tipo de biopigmento se obtuvo en esta etapa del proceso de extracción. En ambos casos, se pudo observar 2 picos más importantes. En la imagen 1, se puede observar dos picos, uno a 290nm y otro a 620nm, el primero podría estar relacionado a compuestos orgánicos presentes en la solución, que pudieron ser sensibles a la luz UV y el segundo indica que fue absorbida dentro del rango de la luz naranja (rojo-amarillento) del espectrofotómetro, que guarda relación con l coloración observada, que era de un tono azulado, característico de la ficocianina, pigmento

de interés. En la imagen 2, producto del barrido comprendido entre las longitudes de onda mencionadas, se observaron nuevamente 2 picos, uno a 290nm, que presentaba un pico más elevado, con esto se pudo deducir que el compuesto orgánico presente pudo absorber mayor cantidad de luz UV, de igual forma, se corroboró la presencia del compuesto de interés, debido a que a 620nm se observó otro pico, característico de los compuestos verdeazulados.

Se obtuvieron picos de las muestras de pellet que fueron resuspendidos en agua y PBS respectivamente, a fin de analizar los mismos por espectrofotometría aplicando análisis de barrido entre 200nm y 800nm, ambas resuspensiones se realizaron a fin de observar diferencias en la absorbancia que pudiesen presentar con uno u otro diluyente. En ambos gráficos se pudo observar que la absorbancia ocurrió en la misma longitud de onda que fue 620nm, el mismo corresponde a los productos verde-azulados, ya que absorben luz naranja (rojo-amarillo), de esta forma quedó demostrado que el producto obtenido correspondía a la ficocianina.

Las mediciones realizadas por espectrofotometría se fue por triplicado del extracto de ficocianina, presentó un pico pronunciado a 620nm donde la C-PC absorbe en su máximo punto, para obtener las absorbancias medias calculadas (tabla 3).

Tabla 3. Valores de las absorbancias medias calculadas de las lecturas espectrofotométricas a 620

Diluyente	1ra réplica	2° réplica	3° réplica	Absorbancia media calculada
Tampón fosfato	1.611	1.603	1.612	1.609
Agua destilada	1.621	1.619	1.627	1.622

Como no se obtuvo un pico diferenciado a 650 nm, imposibilita la obtención de un valor del factor de separación de las ficocianinas con la ecuación de relación de absorbancia (A620/A650).

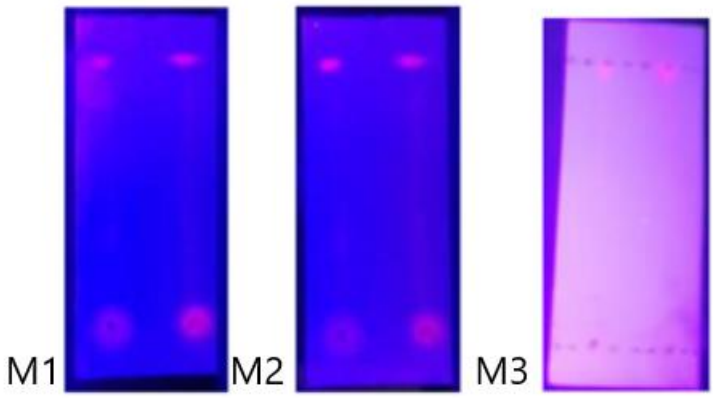
Finalmente, para descartar la existencia de otro pigmento en la muestra obtenida, se procedió a realizar la técnica de Cromatografía en capa fina (TLC). Siguiendo una metodología desarrollada. Las polaridades de las mezclas se calcularon teniendo en cuenta las polaridades de cada uno de los solventes empleados. Los valores que se obtuvieron fueron los siguientes: 3.9 para la primera mezcla, 3.88 para la segunda mezcla y 3,56 para la tercera respectivamente. El orden de elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil, pudiendo ser un disolvente único o dos miscibles de distinta polaridad.

Una vez finalizada la corrida de pigmentos, las placas fueron iluminadas con una lámpara UV. En el lado izquierdo de cada mezcla, se encuentra la muestra resuspendida en agua y del lado derecho, la resuspendida en PBS. La marca de líneas continuas de la base, se observó la mancha que de forma circular que presenta fluorescencia, que corresponde al pigmento azul que fue depositado, en el extremo superior se observó otra mancha que fue lo eluido. El pigmento quedó retenido en la parte inferior, debido a que

no presentaba la misma polaridad que las mezclas. Las manchas que se observaron en la parte superior, pudieron estar relacionadas a compuestos orgánicos o cromóforos de la solución, relacionando estos resultados con los de densidad óptica se puede deducir que no existen otros biopigmentos en la solución final obtenida.

La siguiente imagen (Imagen 1), muestra las tres placas iluminadas por luz UV luego de la corrida de los biopigmentos resuspendidos en agua (M1), y PBS (M2 y M3). En la marca de líneas continuas de la base se observa la mancha de forma circular de color fluorescente que corresponde al pigmento azul que fue depositado y en la parte superior se observa otra mancha que fue lo eluído. El pigmento quedó retenido en la parte inferior debido a que no presentaba la misma polaridad que las mezclas, la mancha observada en la parte superior, podría estar relacionado a los compuestos orgánicos o cromóforos de la solución, relacionando estos resultados con los de densidad óptica se puede deducir que no existen otros biopigmentos en la solución final obtenida.

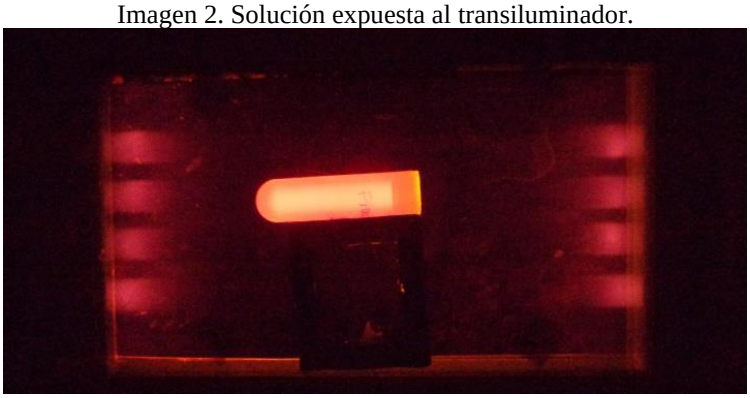
Imagen 1. Placas TLC iluminadas con luz UV



La ficocianina debido a sus numerosas instauraciones conjugadas (cromóforos), presenta absorción en el espectro visible rojo-amarillo con un pico de absorción a los 620nm; reflejándose el color azul característico de este biopigmento.

Finalmente observamos la solución del biopigmento en un transiluminador, para corroborar la fluorescencia que presentaba (Figura 2).

Imagen 2. Solución expuesta al transiluminador.



4 DISCUSIÓN

Existen reportes de varias técnicas para extraer ficocianina de biomasa de *Arthrospira sp,* que podría darse con biomasa húmeda, seca y congelada (Sekar & Handramohan, 2008). El proceso de ruptura debe lograr que las paredes de las cianobacterias que son bastante rígidas, logren romperse a fin de liberar las ficocianina (Wyman, 1992). Las paredes comprenden cuatro capas: fibrillas, peptidoglicanos, proteínas y oligosacáridos, similares a las bacterias gramnegativas (Van Eykelenburg, 1997).

En literatura se han reportado varios métodos de ruptura celular para las cianobacterias, como la homogenización, microondas, sonicación, procesos de fluidos supercríticos y desintegración de lisozimas. Los procesos que se empleen deben ser eficientes, con un alto rendimiento de extracción, así mismo ser respetuoso con el medio ambiente, con el mínimo uso de compuestos químicos (Khadual et al., 2021, Deniz, et al., 2016; Martínez, et al., 2016; Duangsee, et al., 2009)

En el trabajo desarrollado, y empleando la metodología descrita, se buscó obtener ficocianina, no llegando a una purificación por procesos sofisticados como la cromatografía, como los reportados por Khadual, et al., (2021), donde a fin de conocer la pureza de la ficocianina, emplearon procesos cromatográficos.

El método aplicado buscaba disminuir el uso de compuestos químicos muy bruscos, es así que se empleó el sulfato de amonio y el tampón fostato para el proceso de ruptura celular y extracción de ficocianina, que fue viable. Khadual, et al., (2021), implementaron pretratamientos de la biomasa, como agitación, sonicación, ultrasonicación con sonotrodo y métodos de congelación/descongelación, a diferencia de la empleada en este trabajo, donde se fusionó el proceso de congelado/descongelado junto con la sonicación para garantizar una mejor extracción de biopigmentos, así también los solventes utilizados, en el presente trabajo se utilizó sulfato de amonio en el proceso de congelado/descongelado, y finalmente el tampón fosfato, así mismo Khadual, et al., (2021), utilizaron agua y tampón fosfato al igual que en nuestro trabajo, con la variante de dos valores de pH, uno a 6 y otro a 7.

El barrido obtenido por Espectrofotometría indicó la presencia de pigmentos, que según la longitud absorbida, coinciden con los valores obtenidos por otros autores, la absorbancia del pellet resuspendido fue de 1.622 mientras que el resuspendido con tampón fosfato fue de 1.609. Si se hubiese obtenido un pico diferenciado se podría haber obtenido un índice de contenido de ficocianina, que en el trabajo de Van Dan, et al., 2019 fue de 0.1567 mg/ml respecto con el contenido total de *Arthropira máxima*, que fue la cepa con la cepa que trabajaron, en el proceso de extracción modificado de ficobiliproteínas que desarrollaron. Así también los valores obtenidos como promedio de absorbancias en el presente trabajo, superan a los obtenidos por Van Dan et al., (2019), que fue de 1.131 a 620 nm. Con los datos obtenidos, obtuvimos una aproximación a la ficocianina, que fue el biopigmento objetivo dentro del trabajo, que se buscaba obtener fusionando dos metodologías de ruptura celular.

5 CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos, se pudo corroborar, que los productos obtenidos corresponden a un solo tipo de biopigmento, en este caso la ficocianina. Por el análisis espectrofotométrico se pudo determinar que el pigmento absorbió a 620nm, valores corroborados y también contrastado con otros autores que obtuvieron valores de absorción por encima de 1 de Absorbancia., así mismo la cromatografía en capa fina, nos ayudó a saber que solo 1 tipo de biopigmento fue obtenido, descartando la posibilidad de existencia de otro en la misma muestra obtenida.

Los resultados obtenidos, no demuestran en sí la estabilidad de la ficocianina, pero da un precedente de como la fusión de dos metodologías, pueden mejorar la extracción de un biopigemento de interés comercial, de gran aplicabilidad en varios campos de la Biotecnología.

REFERENCIAS

Cohen Z. 1997. The chemicals of Spirulina. In: Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology (Ed. by A. Vonshak), pp 175–204. Taylor and Francis, London, UK.

Christaki, E., Florou-Paneri, P., & Bonos, E. (2011). Microalgae: A novel ingredient innutrition. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 62(8), 794–799.https://doi.org/10.3109/09637486.2011.582460

Becker E.W. 2007. Microalgae as a source of protein. Biotechnology Advances 25: 207–210. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002.

Brune D.E., Lundquist T.J. & Benemann J.R. 2009. Microalgal biomass for greenhouse gas reductions: potential for replacement of fossil fuels and animal feeds. Journal of Environmental Engineering 135: 1136–1144. DOI: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000100.

Díaz Domínguez, G., Marsán suárez, V., & del Valle Pérez, L. (2016). Principales propiedades inmunomoduladoras y antinflamatorias de la ficobiliproteína C-ficocianina. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia, 32(4). Recuperado de http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/451/262

Deniz I, Ozen MO, Yesil-Celiktas O (2016) J Supercritical fluid extraction of phycocyanin and investigation of cytotoxicity on human lung cancer cells. Supercrit Fluids 108:13–18

Derner, R.B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas Chaetoceros muelleri e Thalassiosira fluviatilis, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. Florianópolis, 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

Duangsee R, Phoopat N, Ningsanond S (2009) Phycocyanin extraction from Arthrospira platensis and extract stability under various pH and temperature. Food Innov Asia 2:819–826

El-Baky H.H.A., El Baz F.K. & El-Baroty G.S. 2008. Characterization of nutraceutical compounds in blue green alga Spirulina maxima. Journal of Medicinal Plants Research 2: 292–300. DOI: 10.5897/JMPR.9000331.

Elia Bari, Federico Castillo Cascino, Luciano Foglio, Lorenzo Proietti, Sara Perteghella, Maria Luisa Torre & Katia Parati (2021) Alternative culture media and cold-drying for obtaining high biological value Arthrospira platensis (Cyanobacteria), Phycologia, 60:3, 237-246, DOI: 10.1080/00318884.2021.1899545

Gomont, M. (1892 '1893'). Monografía de Oscillariae (Nostocaceae Homocysteae). Segunda parte. - Adiós. Annals of Natural Sciences, Botany, Serie 7 16:91-264, pls 1-7.

Glazer AN (1989) Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. J Biol Chem 264:1–4

Haney J.F. 1987. Field studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 21: 467–475. DOI: 10.1080/00288330.1987.9516242.

Harun, R., Singh, M., Forde, G., & Danquah, M. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14, 1037-1047.

Hernández-García, A., & Cano-Europa, E. (2012). Phycobiliproteins or C-phycocyanin of Arthrospira (Spirulina) maxima protect against HgCl2-caused oxidative stress and renal damage. Food Chemistry, 135, 2359-2365.

J.C. Tovar-Salamanca and J.P. Ruíz-Díaz, .2016."Propuesta De Escalamiento De Un Fotobiorreactor Para La Microalga Chlorella Vulgaris a Nivel Piloto." Fundación Universidad de América.

Kovač, D., Simeunović, J., Babić, O., Mišan, A. & Milovanović, I. (2013). Algae in food and feed. Food and Feed Research, 40(1), 21-31.

M. Fernández-Ángel, .2013."Diseño, Montaje Y Caracterización De Fotobiorreactores Airlift Para El Cultivo De La Microalga Chlorella Sorokiniana." Universidad EAFIT

Martinez JM, Luengo E, Saldana G, Alvarez I, Raso J (2016) C-phycocyanin extraction assisted by pulsed electric field from artrosphira platensis Food Res. Int 99:1042–1047

Medina-Jaritz, N., Perez-Solis, D., Ruiloba, S., & OlveraRamírez, R. (2011). Antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts from Arthrospira maxima. FORMATEX, 1267-1271

Nuhu, A. (2013). Spirulina (Arthrospira): An Important Source of Nutritional and Medicinal Compounds. Journal of Marine Biology. Recuperado de http://dx.doi.org/10. 1155/2013/325636.

Patel A, Mishra S, Pawar R, Ghosh PK (2005) Purification and characterization of c-phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. Protein Expression Purif 40:248–255

Rippka R., Waterbury J.B. & Stanier R.Y. 1981. Isolation and purification of cyanobacteria: some general principles. In: The Prokaryotes (Ed. by M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows & H.G. Schlegel), pp 212–220. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany.

Safari R, Raftani Amiri Z, Esmaeilzadeh Kenari R (2018) Antioxidant and antibacterial activities of C-phycocyanin from common name Arthrospira platensis. Iran J Fish Sci 19:1911–1927

Santos, M., Seno, L., Ferreira, L., Monteiro, J., Lodi, A., Finocchio, E., & Converti, A. (2012). Metal biosorption onto dry biomass of Arthrospira (Spirulina) platensis and Chlorella vulgaris: Multi-metal systems. Journal of Hazardous Materials, 217-218, 246-255.

Sathasivam R., Radhakrishnan R., Hashem A. & Abd Allah E.F. 2019. Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine. Saudi Journal of Biological

Sekar S, Chandramohan M. Phycobiliproteins as a commodity (2008)Trends in applied research, patents and commercialization. J Appl Phycol. 113–136.

Van Den Hoek, C., Mann, D., & Jahns, H. (1995). Algae. An introduction to Phycology. Londres: Cambridge University Press.

Van Eykelenburg C (1997) On the morphology and ultrastructure of the cell wall of Arthrospira platensis. Antonie Van Leeuwenhoek 43:89–99

Venkataraman, G. (1981). Blue-green algae for rice produc-tion. FAO Soil Bull, 16, 33-42

Villalba Clara; López Tomás; Albrecht Mónica. (2018). Bioprospección De Arthrospira Platensis Nativa Del Chaco Paraguayo Como Propuesta Alternativa Para Fines Alimentarios. Tesis. Universidad Nacional De Itapúa Facultad De Ciencias Y Tecnología. Retrieved From

Space.Conacyt.Gov.Py/Xmlui/Bitstream/Handle/123456789/42696/Tesis-Claravillalba.Pdf?Sequence=1&Isallowed=Y

Vonshak, A. (1997a). Spirulina: growth, physiology and biochemistry. En A. Vonshak (Ed.), Spirulina platensis (Arthrospira). Physiology, cell-biology and biotechnology (p. 43-65). Londres: Taylor y Francis.

Vonshak, A. (1997b). Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell biology and biotechnology. Journal of Applied Phycology, 9, 295-596.

Wang J.H., Zhang T.Y., Dao G.H., Xu X.Q., Wang X.X. & Hu H.Y. 2017. Microalgae-based advanced municipal wastewater treatment for reuse in water bodies. Applied Microbiology and Biotechnology 101: 2659–2675. DOI: 10.1007/s00253-017-8184-x.

Wyman M (1992) An in vivo method for the estimation of phycoerythrin concentration in marine cyanobacteria Synechococcus spp. Limnol Oceanogr

Zarrouk (1966). Construcción para el estudio de una Cyanophycee. Influencia de varios factores físicos y químicos en el crecimiento y la fotosíntesis de Spirulina maxima. (Tesis) vol. 84, Universidad de París

Rodríguez-Sánchez, R., Ortiz-Butrón, R., Blas-Valdivia, V.,