



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y  
MATERIALES

**COMPARACIÓN DE CAROTENOIDES OBTENIDOS A PARTIR DE LA  
ASIMILACIÓN POR *ASTEROMYCES CRUCIATUS* DE CARBOHIDRATOS  
COMPLEJOS PROVENIENTES DE *M. PYRIFERA* Y *D. ANTARCTICA***

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA

GABRIELA ESPERANZA CASTILLO CARTES

PROFESORA GUÍA:  
MARIA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
BARBARA ANDREWS FARROW  
CATALINA LANDETA SALGADO

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por:  
Centro de Biotecnología y Bioingeniería, CeBiB, FB0001

SANTIAGO DE CHILE  
2023

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR  
AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA  
POR: GABRIELA ESPERANZA CASTILLO CARTES  
FECHA: 2023  
PROF. GUÍA: MARIA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

**COMPARACIÓN DE CAROTENOIDES OBTENIDOS A PARTIR DE LA  
ASIMILACIÓN POR *ASTEROMYCES CRUCIATUS* DE  
CARBOHIDRATOS COMPLEJOS PROVENIENTES DE *M. PYRIFERA* Y  
*D. ANTARCTICA***

Los carotenoides son pigmentos naturales que van desde el amarillo al rojo y se encuentran en plantas, hongos y bacterias. Tienen un esqueleto de 40 carbonos con enlaces dobles y grupos terminales que afectan su color y propiedades fisicoquímicas. Su función principal es proteger contra oxidación y atraer polinizadores. Se utilizan en alimentos como pigmentos naturales, antioxidantes y fuente de vitamina A. El hongo *A. cruciatus* podría tener genes para la síntesis de carotenoides y las algas pardas *M. pyrifera* y *D. antarctica*, ricas en carbohidratos complejos pueden ser asimiladas por el hongo como fuente de carbono, aprovechando un recurso renovable de bajo valor en Chile.

El objetivo de este trabajo es comparar los carotenoides obtenidos al fermentar las algas *M. pyrifera* y *D. antarctica* con el hongo marino *A. cruciatus* con tal de identificar cual alga es la fuente de carbono de mejor rendimiento para la producción de carotenoides por peso seco de micelio. Para esto, se realizó un estudio de estrés abiótico para evaluar cómo diferentes longitudes de onda de luz afectan el crecimiento del hongo en un medio con glucosa, logrando diferencias poco significativas, por lo que se continuó con una fermentación en ausencia de luz dado que generó la menor variabilidad. Se emplearon dos metodologías de extracción, calentamiento por ácido y ruptura mecánica con esferas de vidrio, siendo la segunda metodología la que generó un mejor rendimiento. Se realizó una cuantificación mediante espectrofotometría UV-Vis y HPLC en fase reversa con columna C18, generando una cuantificación tentativa. Finalmente, se realizó un estudio de metabolómica mediante UHPLC-QTOF en el que se identificaron 126 metabolitos. Se logra identificar apocarotenal y fucoxantina mientras que dentro del estudio de metabolómica se destaca la presencia de emodina, un pigmento no carotenoide anaranjado en alta intensidad, el cual se propone investigar para futuros proyectos dado sus usos comerciales. Mediante análisis estadísticos de resultados se concluye que no hay diferencias significativas de rendimiento de fucoxantina para el hongo marino fermentado con algas pardas y algas pardas no fermentadas. Por otro lado, para apocarotenal, hay diferencias significativas entre fermentar el hongo con ambas algas y solo algas pardas sin fermentar. Se concluye que *D. antarctica* es una fuente de carbono que podría producir un mayor rendimiento de apocarotenal en comparación a *M. pyrifera* como única fuente de carbono. Se debate si el hongo marino puede producir apocarotenal directamente o si se produce mediante la oxidación directa del  $\beta$ -caroteno, lo que plantea cuestiones sobre vías metabólicas. Los resultados generan discusiones sobre la mejora de la metodología de extracción, identificación y cuantificación. Se sugiere seguir caracterizando los metabolitos secundarios de *A. cruciatus* fermentado en algas pardas y glucosa con énfasis en apocarotenal y emodina.

*A mi kobito, mis profesores, padres, mis amigos del alma  
y sobre todo a mi misma, por seguir adelante.*

# Agradecimientos

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido de manera invaluable a la realización de este trabajo de memoria de título. Mi gratitud más profunda va dirigida a mi profesora guía, María Elena Lienqueo, cuya orientación experta, paciencia, cariño y apoyo constante fueron fundamentales para llevar a cabo este proyecto.

También quiero agradecer a mi co-guía Catalina Landeta, por su valioso aporte y asesoramiento que enriqueció enormemente mi investigación. Agradezco de corazón a los miembros de laboratorio por su colaboración, dedicación y el valioso intercambio de ideas que impulsaron este trabajo hacia adelante.

Mi reconocimiento especial va para Salvador e integrantes del laboratorio de genética por su inestimable ayuda en el campus Juan Gomez Millas y por compartir generosamente su conocimiento. A mi perrito mayor, que estuvo a mi lado durante prácticamente toda mi vida en este camino y me brindó su cariño incondicional.

Quiero extender mi agradecimiento a mi familia por su apoyo constante y comprensión a lo largo de esta travesía académica. Agradezco también a la gente del CeBiB por su colaboración y recursos que fueron de gran utilidad para mi investigación.

Finalmente, quiero dedicar un agradecimiento especial a mí misma por nunca perder la determinación y seguir adelante incluso en los momentos más desafiantes. Cada uno de ustedes ha contribuido significativamente a este logro, y estoy profundamente agradecida por su presencia y apoyo en este viaje. Nunca hubiera llegado tan lejos sin cada uno de ustedes.

# Tabla de Contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Motivación . . . . .	1
1.2. Antecedentes generales . . . . .	3
1.2.1. Pigmentos: Naturales y sintéticos . . . . .	3
1.2.2. Hongos marinos: fuentes de metabolitos secundarios . . . . .	4
1.2.3. Principales usos de carotenoides en el mercado . . . . .	4
1.2.4. Carotenoides y salud humana . . . . .	5
1.2.5. Fuentes de carbono para hongos marinos: Algas Pardas . . . . .	5
1.2.6. Caracterización de carotenoides . . . . .	6
<b>2. Objetivos y Limitaciones</b>	<b>8</b>
2.1. Objetivo General . . . . .	8
2.2. Objetivos Específicos . . . . .	8
<b>3. Marco teórico</b>	<b>9</b>
3.1. Estructura, tipo y propiedades de los Carotenoides . . . . .	9
3.1.1. Formación de estructuras carotenoides y su distribución en los hongos	11
3.1.2. Vías metabólicas de carotenoides en hongos . . . . .	12
3.2. Otros pigmentos de origen fúngico . . . . .	13
3.3. Extracción de carotenoides . . . . .	15
3.4. Fuentes de carotenoides en hongos . . . . .	17
3.5. Fuentes de interferencia en identificación de carotenoides . . . . .	19
3.6. Biomasa proveniente de algas . . . . .	19
3.6.1. <i>Durvillaea antarctica</i> . . . . .	20
3.6.2. <i>Macrocystis pyrifera</i> . . . . .	20
3.7. <i>Asteromyces cruciatus</i> . . . . .	21
3.8. Métodos de caracterización . . . . .	22
3.8.1. Espectrofotometría . . . . .	22
3.8.2. HPLC y UHPLC-QTOF . . . . .	25
<b>4. Materiales y Metodología</b>	<b>29</b>
4.1. Preparación de biomasa e inóculos . . . . .	30
4.1.1. Micelio de <i>A. cruciatus</i> . . . . .	30
4.1.2. Preparación de algas pardas . . . . .	30
4.2. Fermentación . . . . .	30
4.2.1. Medio de cultivo y condiciones . . . . .	31
4.2.2. Fermentación de algas con hongo marino . . . . .	31
4.2.3. Fermentación de hongo marino con estrés abiótico . . . . .	31

4.3.	Liofilización y almacenamiento de muestras . . . . .	32
4.3.1.	Análisis de resultados . . . . .	32
4.4.	Extracción: Pruebas a protocolos de extracción . . . . .	32
4.4.1.	Extracción mediante calentamiento con ácido . . . . .	33
4.4.2.	Extracción mecánica con esferas de vidrio . . . . .	33
4.5.	Cuantificación e identificación . . . . .	33
4.5.1.	Espectrofotometría UV-Vis . . . . .	33
4.5.1.1.	Análisis de resultados . . . . .	33
4.5.2.	Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) . . . . .	34
4.5.3.	Cromatografía líquida de ultra alta resolución- espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuadrupolar (UHPLC-QTOF) . . . . .	34
4.5.3.1.	Análisis de resultados . . . . .	35
<b>5.</b>	<b>Resultados y Discusiones</b>	<b>36</b>
5.1.	Crecimiento de <i>A. cruciatus</i> frente a estrés abiótico . . . . .	36
5.2.	Extracciones de carotenoides . . . . .	39
5.2.1.	Extracción química por calentamiento con ácido . . . . .	39
5.2.2.	Extracción mecánica con esferas de vidrio . . . . .	41
5.3.	Identificación y comparación de carotenoides por HPLC y UHPLC - QTOF .	45
5.3.1.	HPLC, primera fase . . . . .	45
5.3.2.	HPLC, segunda fase . . . . .	47
5.3.3.	UHPLC-QTOF . . . . .	48
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y Recomendaciones</b>	<b>54</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>56</b>
	<b>Anexos</b>	<b>62</b>
A.	Protocolo y resultados de extracción, calentamiento con ácido . . . . .	62
A.1.	Protocolo de extracción de carotenoides, método por calentamiento con ácido. . . . .	62
A.2.	Datos obtenidos . . . . .	63
A.3.	Memoria de calculo y resultados . . . . .	64
B.	Crecimiento de hongo marino con estrés abiótico . . . . .	65
B.1.	Datos obtenidos . . . . .	65
B.2.	Resultados test ANOVA unidireccional . . . . .	65
C.	Datos y resultados extracción mecánica . . . . .	67
C.1.	Datos de experiencias de extracción . . . . .	67
D.	Análisis de datos . . . . .	68
D.1.	Poblaciones incluyendo grupo control . . . . .	69
D.2.	Poblaciones sin grupo control . . . . .	70
E.	HPLC, Gráficos . . . . .	71
E.1.	Análisis y gráficos primera etapa . . . . .	71
E.2.	Analisis y gráficos segunda etapa . . . . .	73
E.3.	Datos de segunda etapa HPLC . . . . .	74
F.	UHPLC-QTOF . . . . .	74
F.1.	Datos de extractos analizados . . . . .	75

# Índice de Tablas

1.1.	Carbohidratos complejos de algas pardas [1] . . . . .	6
3.1.	Propiedades de algunos solventes utilizados en extracción de carotenoides. Obtenido de [3]. . . . .	15
3.2.	Tabla resumen de Hongos con su respectivo rendimiento de carotenoides optimizado y fuentes de carbono utilizadas en la fermentación. Elaboración propia.	18
3.3.	Clorofila, carotenoides y vitamina E en alga parda <i>D. antarctica</i> por peso seco (ps) de alga deshidratada a diferentes temperaturas [55] . . . . .	20
3.4.	Concentración de pigmentos de hojas de <i>M. pyrifer</i> a por gramo de peso seco recogidos a distintas profundidades.[56] . . . . .	21
3.5.	Datos de Absorbancia UV-Visible de carotenoides comunes en distintos solventes obtenidos de [33] . . . . .	24
3.6.	Tabla resumen de coeficientes de extinción y de absorción para carotenoides con su respectivo solvente. Obtenido de [59][33]. . . . .	25
3.7.	Métodos utilizados y tiempos de retención obtenidos para caracterización de carotenoides en distintos hongos. . . . .	26
4.1.	Gradiente de fase móvil utilizada en análisis UHPLC-QTOF . . . . .	35
5.1.	Desviación estándar de mediciones de concentración (mg/ml) de biomasa seca por milímetro de medio de cultivo a distintas longitudes de onda . . . . .	38
5.2.	Promedio y desviación estándar calculados de la mediciones de contenido de carotenoides medido a 450 (nm) . . . . .	43
5.3.	Resumen de datos obtenidos de intensidad (mAU) y tiempos de retención (min) de muestras analizadas en HPLC. . . . .	46
5.4.	Intensidades normalizadas por biomasa extraída ( $I/\mu\text{g}$ ) de cada molécula identificada por análisis UHPLC-QTOF en duplicado, mediciones de muestras independientes. . . . .	50
5.5.	Media y desviación estándar de mediciones de intensidad normalizado por biomasa extraída ( $I/\mu\text{g}$ ) de pigmentos detectados mediante UHPLC-QTOF . . . . .	51
A.1.	Muestra utilizada en gramos y ml de volumen extraído para cada muestra. . .	63
A.2.	Absorbancias obtenidas por espectrofotómetro para diferentes muestras . . . .	63
A.3.	Contenido de carotenoides total obtenido de micelio de <i>A. cruciatus</i> fermentado en medios de glucosa, <i>M. Pyrifer</i> a y <i>D. antarctica</i> . . . . .	64
B.1.	Masa obtenida para fermentación de <i>A. cruciatus</i> expuesto a diferentes longitudes de onda durante su crecimiento. . . . .	65
B.2.	Resultados de test ANOVA para datos de fermentación a distintas longitudes de onda . . . . .	66
B.3.	Resultados de test de comparación múltiple de Games-Howell entre dos grupos para todos los grupos de estudio. . . . .	66

C.1.	1.- Datos extracción de biomasa liofilizada y contenido de carotenoides calculado en base a resultados de absorbancia obtenidos a 450 (nm) con ley de Beer-Lambert	67
C.2.	2.- Datos extracción de biomasa liofilizada y contenido de carotenoides calculado en base a resultados de absorbancia obtenidos a 450 (nm) con ley de Beer-Lambert	67
C.3.	3.-Datos extracción de biomasa liofilizada y contenido de carotenoides calculado en base a resultados de absorbancia obtenidos a 450 (nm) con ley de Beer-Lambert	68
C.4.	4.- Datos extracción de biomasa liofilizada y contenido de carotenoides calculado en base a resultados de absorbancia obtenidos a 450 (nm) con ley de Beer-Lambert	68
D.1.	Resultados de prueba Brown-Forsythe ANOVA de comparaciones entre contenido de carotenoide de biomasa extraída, indicando que hay un grupo que es significativamente diferente. . . . .	69
D.2.	Comparaciones múltiples de Games-Howell con valor P ajustado para cada par de grupos comparados y valor de intervalo de confianza. . . . .	69
D.3.	Resultados de prueba Brown-Forsythe ANOVA de comparaciones entre contenido de carotenoide de biomasa extraída excluyendo grupo control, indicando que no hay diferencias significativas. . . . .	70
D.4.	Comparaciones múltiples de Games-Howell con valor P ajustado para cada par de grupos comparados y valor de intervalo de confianza excluyendo grupo control.	70
E.1.	Datos de intensidad (mAU) y área bajo la curva de análisis HPLC para ambos peaks detectados a diferentes longitudes de onda de extracto de <i>A. cruciatus</i> fermentado con glucosa . . . . .	74
F.1.	Datos de extractos analizados mediante UHPLC-QTOF . . . . .	75
F.2.	Datos obtenidos de <i>Metaboscape</i> modo positivo, intensidad medida de cada muestra analizada . . . . .	75
F.3.	Datos obtenidos de <i>Metaboscape</i> modo positivo, intensidad normalizada por biomasa extraída (intensidad/ $\mu\text{g}$ ) de cada muestra analizada . . . . .	75
F.4.	Valores P calculados a través de prueba t de Welch, asumiendo que las desviaciones estándar no son iguales y las mediciones son independientes entre si. Lado superior derecho corresponde a comparaciones de intensidades de Apocarotenal, lado inferior izquierdo corresponde a comparaciones entre intensidades de Fucoxantina . . . . .	76

# Índice de Ilustraciones

1.1.	Las tendencias comerciales de los carotenoides para el año 2019, figura traducida y obtenida de [5]. . . . .	2
1.2.	Esquema de diferentes pigmentos naturales y uso en la industria alimentaria. [11]	3
1.3.	<i>Macrocystis pyrifera</i> y <i>Durvillea antarctica</i> . . . . .	6
3.1.	Unidad isoprenoide. [3] . . . . .	9
3.2.	Grupos terminales presentes en las moléculas de carotenoides [3] . . . . .	10
3.3.	Metabolismo de $\beta$ -caroteno. Perteneciente a [35]. . . . .	11
3.4.	Esquema hipotético de carotenoides dentro de membrana lipídica. [2] . . . . .	12
3.5.	Esquema simplificado de vías metabólicas para producción de carotenoides en plantas, hongos y bacterias. [38] . . . . .	13
3.6.	Pigmentos fúngicos (carotenoides y policetidos) junto con su coloración y estructura química. Obtenido de [40] . . . . .	14
3.7.	Estructura química de emodina [41] . . . . .	14
3.8.	Métodos novedosos de producción y extracción de carotenoides desde algas y hongos. Figura obtenida de [32] . . . . .	16
3.9.	<i>Asteromyces cruciatus</i> cultivado en un medio de agua de mar artificial al 2% de salinidad con glucosa en concentración 20 (g/L). Laboratorios del CeBiB. . . . .	21
3.10.	Espectro de absorción de: Clorofila a (a), Clorofila b (b) y $\beta$ -caroteno (c) [58] . . . . .	23
3.11.	HPLC en fase reversa de una muestra de carotenoides obtenidos de <i>P. rhodozyma</i> . Astaxantina (a), licopeno (b) y $\beta$ -caroteno (c). [2] . . . . .	26
3.12.	Estructuras químicas y espectros de masas de luteína y zeaxantina mostrando la fragmentación en la fuente, obtenido de [3]. . . . .	28
4.1.	Diagrama de bloques de metodología empleada y parámetros utilizados, Elaboración propia . . . . .	29
4.2.	Cultivo de micelio de <i>A. cruciatus</i> , laboratorios CeBiB . . . . .	30
4.3.	Modelo experimental de fermentación con estrés abiótico de <i>A. cruciatus</i> en medios con única fuente de carbono glucosa. El matraz negro indica sin exposición de luz, matraz blanco indica luz blanca directa del equipo, matraz azul indica luz azul y matraz rojo indica luz roja. Elaboración propia. . . . .	32
5.1.	Análisis de varianza ANOVA, promedio de concentración en (g/ml) y desviación estándar de biomasa seca por milímetro de medio de cultivo fermentado con única fuente de carbono glucosa, por 8 días a 25°C en distintas longitudes de onda, no se detecta diferencias significativas entre cada grupo (ns). . . . .	37
5.2.	Resultado de fermentación de <i>A. cruciatus</i> con glucosa en 20(g/L) después de 8 días. En la izquierda (A) el hongo fermentado con luz blanca mientras que a la derecha (B) el hongo fermentado en ausencia de luz. . . . .	38
5.3.	Gráfico de concentración de carotenoides por gramo de biomasa extraída, fermentación por 8 días a 25°C . . . . .	40

5.4.	Absorbancias medidas de extracto de <i>A. cruciatus</i> fermentado con distintas fuentes de carbono, método de extracción calentamiento con ácido. . . . .	41
5.5.	Resultados de estudio ANOVA de datos obtenidos de cuantificación de carotenoides de extracto de algas pardas y extracto de la fermentación de hongo marino <i>A. cruciatus</i> con fuentes de carbono algas pardas y glucosa. La fermentación dura 8 días a 25°C. Se detectan diferencias significativas (**) en contenido de carotenoides para la fermentación con única fuente de carbono glucosa, mientras que para las fermentaciones con algas y solo algas no presentan diferencias significativas entre si (ns). . . . .	42
5.6.	Absorbancias medidas a distintas longitudes de onda de biomasa extraída en experiencia de extracción mecánica . . . . .	44
5.7.	Extractos de biomasa liofilizada, donde (a) <i>A.c</i> fermentado con <i>D. antarctica</i> , (b) <i>A.c</i> fermentado con <i>M. pyriferá</i> , (c) Extracto de alga parda <i>D. antarctica</i> sin fermentar y (d) <i>A.c</i> fermentado con glucosa. . . . .	44
5.8.	Análisis HPLC fase reversa de extracto de <i>A. cruciatus</i> fermentado en glucosa medido a 433 (nm) . . . . .	48
5.9.	Estructura química de (1) fucoxantina, (2) emodina y (3) 8'-apo-beta,psi-caroten-8'-al, imágenes obtenidas de [69] . . . . .	49
5.10.	Vía metabólica hipotética de <i>A. cruciatus</i> para la producción de carotenoides identificados mediante UHPLC-QTOF, esquema perteneciente a[39]. . . . .	53
E.1.	Estándares de $\beta$ -caroteno y Astaxantina, medidos a 465 (nm). . . . .	71
E.2.	Análisis de extrato de <i>A. cruciatus</i> en medio de glucosa medido a 465 (nm) . .	71
E.3.	Extracto de <i>A. cruciatus</i> en medio con única fuente de carbono alga <i>D. antarctica</i> medida a 450 (nm) . . . . .	72
E.4.	Extracto de alga parda <i>D. antarctica</i> medida a 465 (nm) . . . . .	72
E.5.	Extracto de alga parda <i>D. antarctica</i> medida a 450 (nm) . . . . .	72
E.6.	Estándar de $\beta$ -caroteno medido a 433 (nm) . . . . .	73
E.7.	Extracto de <i>A. cruciatus</i> con única fuente de carbono glucosa medido a 433 (nm)	73

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Motivación

El mundo se enfrenta al desafío de garantizar recursos necesarios con enfoque especial en los alimentos con tal de que la población pueda tener una buena calidad de vida. La creciente preocupación por la salud y el bienestar ha incrementado la inclusión de ingredientes funcionales en suplementos dietéticos, nutracéuticos y farmacéuticos. Los carotenoides son un ejemplo de compuestos de alto valor, suplementados en varios productos tales como antioxidantes, pigmentos naturales y cosméticos [1][2].

Los carotenoides son un grupo de pigmentos de origen vegetal que poseen propiedades antioxidantes, actividad fisiológica, y algunos son precursores de la vitamina A. su versatilidad de aplicaciones en productos desde la industria alimenticia hasta cosmética hacen que se espere que provea de crecimiento económico y oportunidades en el mercado, además de varios beneficios a la salud asociados al consumo de carotenoides que podría contribuir a una mayor demanda de estos productos. La ingesta de  $\beta$ -caroteno y otros carotenoides es recomendada por gobiernos y entidades científicas en el departamento de agricultura de US (USDA y el instituto nacional de cáncer US) [3].

El mercado alimentario, farmacéutico, cosmético y textil busca actualmente alternativas naturales a los colorantes sintéticos. En particular, la industria alimentaria se enfrenta a presiones para incorporar pigmentos naturales debido a las preocupaciones de los consumidores acerca de los colorantes sintéticos y su impacto negativo en la salud humana. Algunos pigmentos sintéticos se ha demostrado que tienen efectos cancerígenos y teratogénicos, además de causar un impacto ambiental al ser vertidos en las aguas residuales. La creciente rigurosidad en la regulación de los pigmentos sintéticos que afectan la salud humana y animal está impulsando la demanda de pigmentos naturales. Se proyecta que el valor de los pigmentos naturales, como los carotenoides, alcanzará los 1.84 billones para el año 2027. En la figura 1.1 se puede observar el detalle en porcentajes de los carotenoides más representativos en el mercado para el año 2019.[4][5]

## Mercado global de Carotenoides

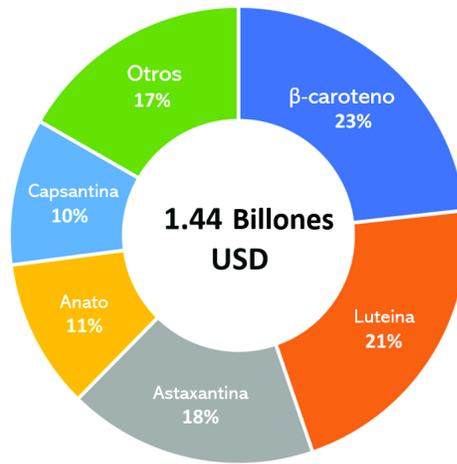


Figura 1.1: Las tendencias comerciales de los carotenoides para el año 2019, figura traducida y obtenida de [5].

En la producción a gran escala de carotenoides, se requiere el uso de productos agrícolas de los cuales se pueden extraer directamente estos compuestos, lo que se estima que reduce los recursos disponibles para alimentación. A su vez, presentan inestabilidad, disponibilidad estacional y un alto coste considerando aplicaciones industriales [2].

Por estas razones se ha investigado bastante en el ámbito académico e industrial para estudiar los hongos filamentosos como fuente sostenible y económica de pigmentos naturales. Los hongos filamentosos marinos fermentan algas, produciendo a su vez metabolitos secundarios, entre ellos carotenoides. Por esto, las algas pardas se presentan como un recurso renovable, disponible y que no hace uso de suelos fértiles como fuente de carbono para producción de carotenoides [6]. Chile se posiciona como un lugar ideal para la cosecha de algas pardas, las que pueden ser obtenidas en su estado salvaje y por lo anterior han creado cambios en los marcos regulatorios que incentivan el cultivo y reforestación de estas algas.[7]. De algunos estudios (Camus et al., 2019) se rescata que en Chile es rentable el cultivo considerando aspectos biológicos, tecnológicos y económicos en 2016. El valor, la productividad y el modelo de cultivo utilizado son factores clave para el éxito económico del cultivo de algas marinas.[8][9]

Por último, explorar la diversidad de metabolitos en organismos poco conocidos se presenta como una oportunidad para contribuir al conocimiento y posibles aplicaciones a diversos campos[10]. La producción de carotenoides por hongos marinos con algas pardas como fuente de carbono para su crecimiento, tiene el potencial de establecer una industria que le otorgue un valor agregado a recursos naturales chilenos, como las algas, además de aportar a nuevos campos industriales para la utilización de esta materia prima, por lo tanto estimar el rendimiento de carotenoides producidos por la fermentación de distintas algas pardas de este estudio puede dar una noción de usos comerciales que se les pueden dar y por consiguiente poder generar estudios de factibilidad económica conociendo el rendimiento de carotenoides por peso seco de micelio producido gracias a la fermentación con algas pardas como *Macrocystis pyrifera* y *Durvillaea antarctica*.

## 1.2. Antecedentes generales

### 1.2.1. Pigmentos: Naturales y sintéticos

Los pigmentos son la mayor fuente de colores, que son una parte crucial de cada planta y organismo, en caso de ser pigmentos naturales. Los pigmentos son ampliamente utilizados como aditivos en la industria alimenticia con el fin de impartir color, mejorando la percepción de los productos. Contribuyen a la identificación de un alimento, mantiene su calidad sensorial, mejora el color original y genera uniformidad de color en distintos productos. Estos pigmentos son compuestos significativos en la industria alimenticia dado su diversos atributos funcionales. El color es parte esencial de alimentos o productos dado que afecta la aceptación del consumidor, además, el color de los alimentos podría indicar su frescura, seguridad e índices de valores sensoriales. En los últimos años el interés de los consumidores ha cambiado a productos con pigmentos naturales dado su inocuidad y beneficios a la salud en comparación con pigmentos sintéticos.[11][12]

Entre los pigmentos naturales normalmente utilizados se encuentran: betalaínas-betaxantina, betacianina, flavonoides-antocianinas, **carotenoides-luteína**, **zeaxantina**,  **$\beta$ -caroteno**, y clorofilas-clorofilinas, como se puede observar en la figura 1.2. No obstante, existen algunas restricciones asociadas al uso de pigmentos naturales basadas en la fuente del pigmento, la cantidad y la naturaleza del producto.[11]

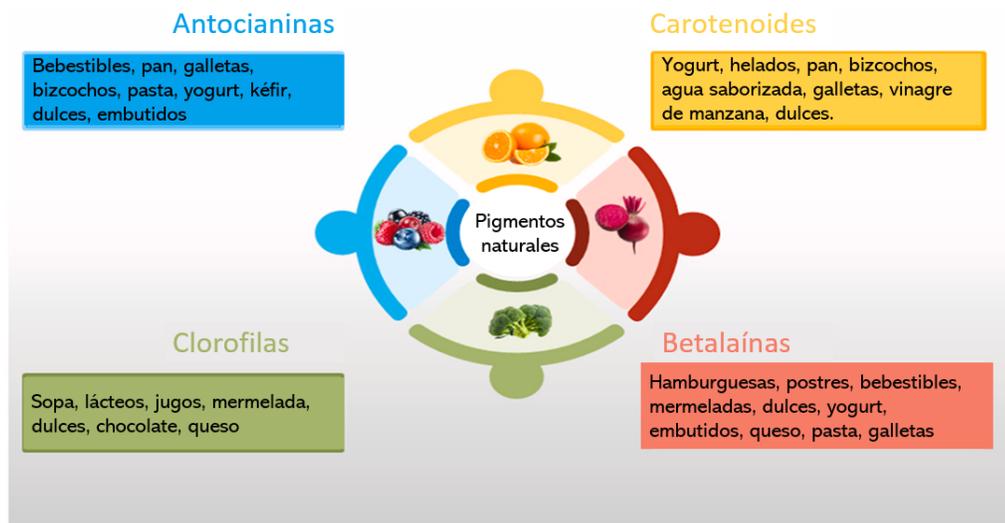


Figura 1.2: Esquema de diferentes pigmentos naturales y uso en la industria alimentaria. [11]

Por otro lado, dentro de los pigmentos sintéticos, su uso se remonta al siglo XIX, originalmente se utilizaron pigmentos extraídos de vegetales y posteriormente de minerales, dado su toxicidad se sustituyeron rápidamente por pigmentos orgánicos obtenidos de manera sintética, desde entonces el coloreado artificial en productos ganó gran importancia en la industria. En la actualidad los pigmentos artificiales son formulados y aceptados en muchos países para consumo humano, aunque en otros existe debates sobre sus posibles efectos negativos para

la salud.[13] [14]

Los diferentes tipos de colorantes artificiales se diferencian por su forma de obtención, color o tipo de alimentos en los que se puede usar y si están aprobados para consumo humano. Por ejemplo se tienen los colorantes azoicos, que contienen un grupo azoico que le confiere la propiedad de ser solubles en agua, dentro de los principales pigmentos sintéticos azoicos aprobados para consumo humano se encuentran: tartrazina (E-102), amarillo anaranjado S (E-110), azorrubina, carmoisina, (E-122), amaranto (E-123), rojo Ponceau 4R, (E-124), Negro brillante BN (E-151), Marrón FK (E-154), Litol Rubina BK (E-180), entre otros.[14]

Otros colorantes artificiales son derivados del trifenilmetano y son utilizados ampliamente en el mercado Estadounidense, pero su uso está prohibido en la Unión Europea, por lo que varios productos con este tipo de colorantes no pueden ser comercializados en esos países. También hay una amplia gama de colorantes no autorizados para consumo humano, sin embargo, son utilizados para otros artículos como textiles[14][15].

### **1.2.2. Hongos marinos: fuentes de metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos producidos por todo ser vivo y que no están directamente relacionados con crecimiento, reproducción o desarrollo propio del organismo, no obstante, su ausencia podría suponer el deterioro a largo plazo de la capacidad de supervivencia del organismo. Estos compuestos poseen actividades bioactivas y se han estudiado por su potencial biotecnológico y farmacológico. En la dieta humana, los metabolitos secundarios tienen usos medicinales y sensoriales como color y sabor.[16]

Los hongos marinos son una fuente diversa de metabolitos secundarios, producidos por la fermentación de materia orgánica, como algas y que al 2010 exceden más de 1000 compuestos diferentes identificados.[17]. Dentro de las categorías de metabolitos secundarios se destacan los policétidos, alcaloides, terpenoides, péptidos y lípidos. En específico, los terpenoides, producidos por hongos ascomycota y basidiomycota han sido identificados como micotoxinas, antibióticos, antitumorales y fitohormonas. Además, los carotenoides pertenecen al grupo de los terpenoides dado que derivan de la misma unidad básica, el isoprenoide y, por lo tanto, se sintetizan a través de la misma vía metabólica.[18]

### **1.2.3. Principales usos de carotenoides en el mercado**

Entre las principales aplicaciones de los carotenoides se encuentran como pigmento natural para alimentos, como fuente de provitamina A o retinol, complemento alimenticio, pigmentación para acuicultura, aditivo cosmético y antioxidante [19]. Los productos alimenticios con carotenoides se están expandiendo constantemente en el mercado, especialmente en países con crecientes regulaciones alimenticias. Los pigmentos son obtenidos por microalgas, cianobacterias, hongos y en algunos desechos industriales. A continuación se lista a mayor detalle los usos más recurrentes en el mercado.[20]

- **Industria alimentaria:** Como pigmento natural para diferentes productos, como atributo sensorial asociado a seguridad y valor nutricional, especialmente aquellos alimentos con contenido de lípidos por las características lipofílicas de los carotenoides. Puede ser introducido directamente al alimento como bebestibles o grasas, como mantequilla y

aceites o indirectamente a alimento para animales con el fin de mejorar la pigmentación de huevos o carne de pescados.[21]

- **Farmacéutica y nutracéutica:** Cada carotenoide tiene una bioactividad única causada por las estructuras específicas de la molécula. Además, varios carotenoides como el  $\beta$ -caroteno y la  $\beta$ -criptoxantina son muy importantes como provitamina A. Dado que los animales y humanos no pueden sintetizar los carotenoides, los pigmentos deben complementarse en las dietas, por lo que se ofrece en el mercado en formato de suplemento alimenticio.[22]
- **Agroindustria:** Los carotenoides se utilizan en el sector de la agroindustria para cuidar la salud y mejorar la calidad de los productos de origen animal, en específico, mejorar la coloración de la carne de peces o huevos en la acuicultura y avícola, respectivamente. Los carotenoides se mezclan con el alimento como parte de los nutrientes que favorecen la salud animal. La luteína, astaxantina, zeaxantina, capsantina y la cantaxantina son los principales carotenoides utilizados en la nutrición animal. La alimentación debe ser tal que proporcione una dieta equilibrada al animal de modo que se consiga un alto rendimiento.[23]
- **Cosmética:** Los cosméticos a base de carotenoides poseen atractivo estético, mayor absorción tópica, rendimiento y características sensoriales. Se reporta que tienen efectos contra el envejecimiento prematuro de la piel. Los informes epidemiológicos, los beneficios para la salud y los estudios mecanicistas han demostrado los efectos saludables de los carotenoides como cosméticos humanos.[24]

#### 1.2.4. Carotenoides y salud humana

Los carotenoides son antioxidantes potentes en el cuerpo humano, ayudando a neutralizar radicales libres los cuales son moléculas inestables que causan estrés oxidativo, generando daño en las células y aumentando el riesgo de enfermedades crónicas como cáncer y degeneración macular dado por la edad. Algunos carotenoides como  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina tiene actividad provitamina A dentro del cuerpo, la cual es esencial para los tejidos relacionados a la visión, asegurando la integridad del tejido epitelial como piel y membranas mucosas. Con respecto a la salud de los ojos, particularmente la luteína y zeaxantina se concentran en la macula del ojo en el cual ayudan a proteger contra daño oxidativo. Su consumo se asocia a la reducción de riesgo de pérdida de visión por edad.[25][26]

Otra de sus funciones es como antiinflamatorio jugando un papel importante en la prevención de complicaciones cardiovasculares. Esta propiedad puede ayudar a modular respuestas inmunes y reducir inflamación crónica así también como complicaciones relacionadas a la diabetes. Sumado a lo anterior, otros carotenoides como licopeno están asociados con la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, dado que podrían prevenir la oxidación de colesterol LDL lo cual es un paso crítico en el desarrollo de aterosclerosis. Otras funciones incluyen actividad antitumoral, inmunomodulación y protección del ADN contra peroxidación, a la fecha, las funciones de provitamina A ha sido demostrada en humanos.[27]

#### 1.2.5. Fuentes de carbono para hongos marinos: Algas Pardas

Los hongos marinos viven en diversos ambientes oceánicos y su distribución va desde las costas hasta mar abierto. En específico, los hongos asociados a macroalgas poseen enzimas y

actividad metabólica para degradar y asimilar sus carbohidratos complejos, incluso aumentando su digestibilidad y propiedades funcionales. El uso de algas como sustrato y fuente de carbono para hongos marinos se presenta como una opción que tiene una alta productividad, con la característica de ser un recurso renovable y disponible para la producción de metabolitos secundarios de interés industrial.[1]

Las algas pardas, como *M. Pyrifera* y *D. Antarctica*, como se ve en la Figura 1.3 son una fuente rica de carbohidratos complejos, además de ser un recurso marino altamente disponible [6]. Estos carbohidratos se encuentran en forma de polisacáridos y desempeñan funciones importantes en la estructura y fisiología de las algas, pueden presentar hasta un 40 % de su peso seco como alginato además de poseer proteínas, minerales y vitaminas.[6][1].



Figura 1.3: *Macrocystis pyrifera* y *Durvillea antarctica*.

Los carbohidratos complejos de las algas pardas tienen un gran potencial para su uso en diversas aplicaciones biotecnológicas y pueden ser objeto de investigación en el desarrollo de nuevos productos y tecnologías. En específico se tiene la composición estándar de algas pardas como se ve en la tabla 1.1:

Tabla 1.1: Carbohidratos complejos de algas pardas [1]

Macroalga	Fibra soluble	Fibra insoluble
Algas pardas	Laminarina: $\beta$ -(1,3)-and $\beta$ -(1,6)-glucosa (3:1), manitol, Alginato: $\beta$ -(1,4)-acido manuronico and $\alpha$ -(1,4)-acido guluronico Fucanos/fucoidan: $\alpha$ -L-fucosa, sulfato, acido manuronico, xilosa, galactosa, glucosa, manosa	Celulosa $\beta$ -(1,4)-glucosa

### 1.2.6. Caracterización de carotenoides

Los carotenoides son componentes orgánicos coloridos que contienen sistemas conjugados de dobles enlaces, por lo tanto para su caracterización las propiedades respecto a la luz que absorben o emiten pueden otorgar información para su identificación y cuantificación[2]. La caracterización de estos compuestos se puede realizar mediante varios métodos. Dentro de los más comunes se encuentran:

- **HPLC o Cromatografía líquida de alto desempeño (presión):** Es una técnica

ampliamente utilizada para el análisis de carotenoides, implica la separación identificación y cuantificación de carotenoides basado en sus propiedades químicas y de absorción de luz en el espectro visible. Distintos tipos de detectores como UV-Vis o detector de arreglo de diodos son utilizados para identificar carotenoides de forma individual.[3]

- **Espectrometría de masas (MS):** Técnica micro analítica utilizada junto a HPLC para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos al mismo tiempo que identificar estructura y propiedades químicas de los compuestos en muestras complejas, requiere cantidades pequeñas de muestra y se puede obtener información como peso, carga y estructura del analito. La muestra se ioniza, pierde electrones y se fragmenta, mediante un acelerador de iones y se conduce a un colector/analizador, en el cual se recogen los impactos de los iones en función de la relación carga/masa. Al comparar el espectro de masa con bases de datos se puede determinar la identidad de un compuesto. Para carotenoides se identifica peso molecular y terminales principalmente [28][3].
- **Espectrofotometría o espectroscopia UV-Visible:** Es un método simple y ampliamente utilizado para la caracterización de carotenoides. Los carotenoides tienen un espectro de absorción distintivo en el rango visible de luz, entre 400 y 500 (nm), lo cual se puede medir y consiguientemente identificar y cuantificar. Este método se puede combinar con HPLC para generar un análisis más completo de los carotenoides a identificar.[29]

Otros métodos incluyen **FTIR** (Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier) y **RMN** (Resonancia magnética nuclear) las cuales tienen una función complementaria para la identificación de carotenoides. La combinación de técnicas de FTIR y RMN puede utilizarse para caracterizar los carotenoides, identificar sus grupos funcionales, confirmar la presencia y la posición de los enlaces dobles conjugados, y obtener información detallada sobre su estructura química y composición. Estas técnicas son herramientas poderosas en el análisis de carotenoides y pueden ser utilizadas en estudios de investigación.[30][31]

# Capítulo 2

## Objetivos y Limitaciones

### 2.1. Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es:

- Comparar los carotenoides obtenidos por asimilación de algas pardas *M. pyriferá* y *D. antarctica* por el hongo marino *Asteromyces cruciatus* por medio de técnicas como Espectrofotometría y Cromatografía líquida de alta presión.

### 2.2. Objetivos Específicos

Para lograr el objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Determinar teóricamente posibles vías metabólicas para la producción de carotenoides en hongos marinos.
- Determinar los efectos de distintas longitudes de onda en el crecimiento de *Asteromyces cruciatus* con única fuente de carbono glucosa.
- Implementar un protocolo de laboratorio para extracción y caracterización de carotenoides provenientes de fermentación de algas pardas *M. pyriferá* y *D. antarctica* con el hongo marino *Asteromyces cruciatus*.
- Comparar los carotenoides obtenidos desde la asimilación de algas pardas *M. pyriferá* y *D. antarctica* por el hongo *Asteromyces cruciatus*.
- Determinar cual alga parda asimilada por el hongo marino posee el mejor rendimiento de producción de carotenoides por peso seco de micelio.

# Capítulo 3

## Marco teórico

### 3.1. Estructura, tipo y propiedades de los Carotenoides

Los carotenoides son metabolitos secundarios, lipofílicos, producidos por plantas, hongos y bacterias. Así mismo son pigmentos tetraterpenoides constituidos por un esqueleto de 40 carbonos (C<sub>40</sub>), formados por ocho unidades isoprenoideas [32], como se ve en la figura 3.1 y distintas combinaciones de terminales, que se pueden clasificar como anillos cíclicos o acíclicos [3]. Algunos de los distintos grupos terminales presentes en carotenoides se representa en la figura 3.2.

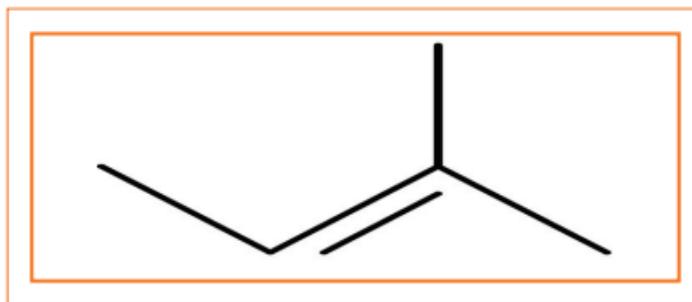


Figura 3.1: Unidad isoprenoide. [3]

La característica estructural de dobles enlaces conjugados o cromóforo, le otorga un alto potencial reductor y es el principal responsable de la coloración que puedan poseer dado que absorbe luz entre 400 (nm) y 500(nm) de longitud de onda lo cual es la principal propiedad en la cual se basa la identificación y cuantificación de los carotenoides. En concreto, estos pigmentos son los que generan tonalidades amarillo, naranja y rojo a diferentes frutas y verduras como zanahorias o tomate, en microalgas y hongos por dar algunos ejemplos. Poseen funciones biológicas dedicadas a absorción de energía lumínica, atracción de polinizadores, protección contra radicales libre y propiedades antioxidantes.[3]

Basándose en su estructura química, los carotenoides se pueden clasificar como Carotenos y Xantofilas. Los carotenos como  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -caroteno no poseen oxígeno en su composición mientras que las Xantofilas como astaxantina y zeaxantina son derivados oxigenados

de los carotenos, pueden poseer grupos hidroxilo, epoxido o carbonilo. También se pueden clasificar según su funcionalidad como precursores de vitamina A en el cuerpo humano. En la naturaleza, los carotenoides se encuentran en su forma más estable la cual es *trans*, pero una pequeña cantidad se puede encontrar como isómeros con configuración *cis*. [19][33]

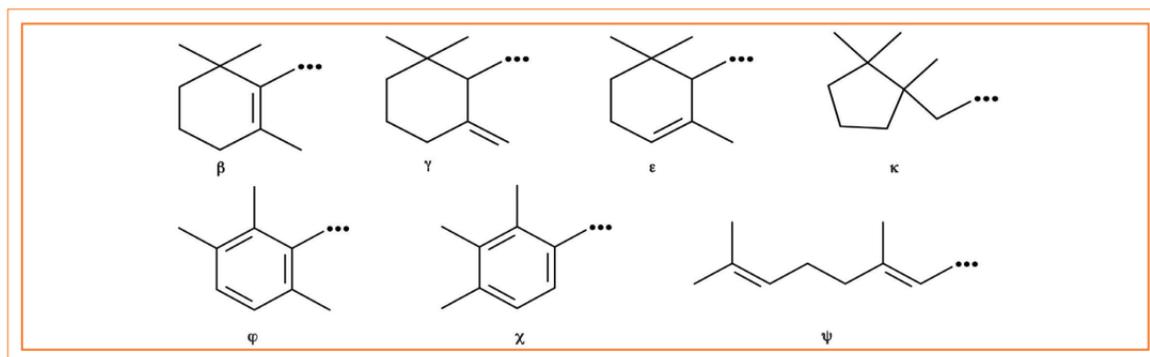


Figura 3.2: Grupos terminales presentes en las moléculas de carotenoides [3]

Algunos carotenoides específicos de interés para el presente estudio son fucoxantina,  $\beta$ -caroteno y sus carotenoides derivados de la oxidación directa. En específico la xantófila denominada fucoxantina es un metabolito secundario presente mayoritariamente en los cloroplastos de algas pardas, el cual desempeña un papel importante en la captación de luz y la fotoprotección para la utilización eficaz de la luz y la regulación de la fotosíntesis. En su estructura se encuentra un enlace epóxido y grupos hidroxilo junto con un enlace alénico (dos dobles enlaces carbono-carbono adyacentes) y un grupo carbonilo conjugado en la cadena poliénica, coloración anaranjada-marrón y propiedades antioxidantes como también contra la obesidad. En los países del sudeste asiático, las algas pardas con alto contenido de fucoxantina se utilizan tradicionalmente como fuente de alimento.[23][34].

Por otro lado, el  $\beta$ -caroteno o  $\beta,\beta$  caroteno es un carotenoide con 15 enlaces dobles, dos anillos  $\beta$ , no polar, de color amarillo anaranjado y que además se destaca como el precursor más abundante y mejor caracterizado de la vitamina A en la dieta humana [19]. Sin embargo, también es común encontrar variantes del carotenoide mencionado como apocarotenoides, los cuales provienen de una escisión asimétrica de uno de los anillos  $\beta$  terminales, dado por un proceso de oxidación, el cual puede ser generado por contacto con oxígeno o enzimas en procesos metabólicos de organismos que consumen materia orgánica, que a su vez, contiene  $\beta$ -caroteno. De forma análoga, los apocarotenoides poseen propiedades antioxidantes moderadas en comparación a  $\beta$ -caroteno, pero comparte características de pigmentación, siendo útil como colorante natural y suplemento [19][35]. En la figura 3.3 se puede observar los distintos productos de la escisión enzimática de  $\beta$ -caroteno y la vía metabólica que genera retinol y ácido retinoico.

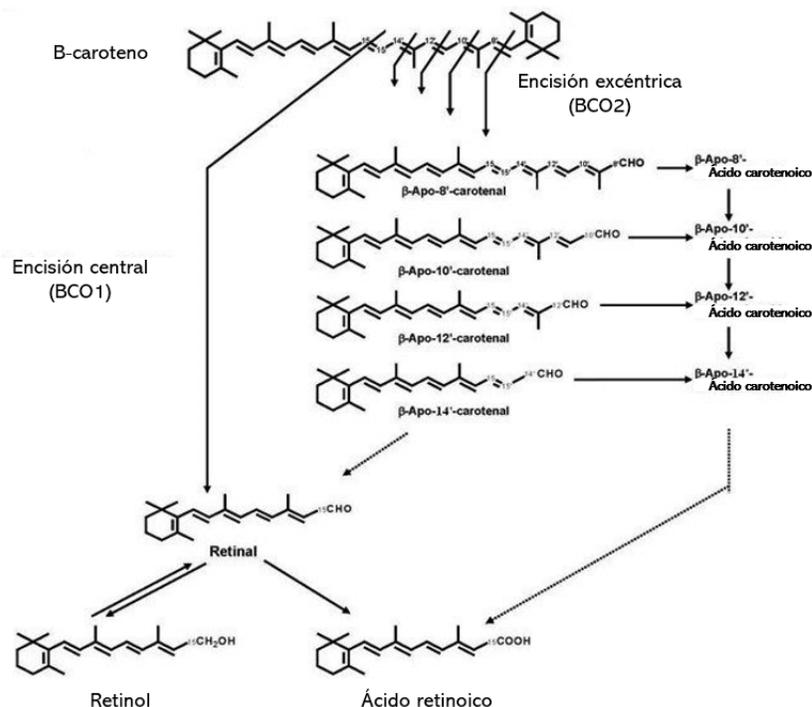


Figura 3.3: Metabolismo de  $\beta$ -caroteno. Perteneciente a [35].

### 3.1.1. Formación de estructuras carotenoides y su distribución en los hongos

Como parte del linaje arquea de los organismos eucariontes, los hongos (eucariotas) heredaron el potencial de biosíntesis de carotenoides por parte de las arqueas, por lo tanto, los carotenoides se pueden encontrar en especies de todo el phylum de los hongos. Debido a la relación evolutiva con arquea, los hongos heredan la vía del mevalonato de acetyl-CoA para la síntesis de precursores de carotenoides y no cuentan con la vía alternativa de la desoxixilulosa-5-fosfato, la cual predomina en bacterias. En varios hongos, la síntesis de carotenoides está foto-regulada.[36]

Los carotenoides no se encuentran como moléculas libres en el citoplasma de la célula de un hongo, más bien están presentes en cápsulas lipídicas o en membranas, también están asociadas a proteínas o lipoproteínas. La localización y orientación depende de la estructura de los terminales, lipofilidad y modificaciones químicas como hidroxilación y esterificación lo que cambiaría su polaridad. La identificación de estos procesos es fundamental para entender su practicalidad, ya que los carotenoides en la mayoría de los organismos son intracelulares y la regulación de su síntesis y rendimiento máximo podría estar relacionado con el espacio disponible en la célula.[2]. En la figura 3.4 se puede observar un esquema de como estaría orientado en la bicapa lipídica algunos carotenoides como  $\beta$ -caroteno y astaxantina dado la polaridad de sus grupos terminales.

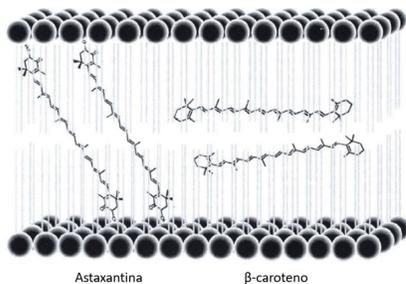


Figura 3.4: Esquema hipotético de carotenoides dentro de membrana lipídica. [2]

La orientación de los carotenoides en una membrana dependería de su estructura y de la composición de la membrana. Basado en resonancia magnética nuclear y dicroísmo lineal, es posible demostrar que el  $\beta$ -caroteno y los carotenoides no polares, como el licopeno, tienden a ubicarse paralelamente a la superficie de la membrana. Por el contrario, los carotenoides que poseen dihidroxi y dicarbonilo como la astaxantina entran en contacto con los sitios polares de la membrana. (grupos fosforilo), mientras que el cromóforo se encuentra dentro del núcleo hidrofóbico, como se puede observar en la figura 3.4. Sin embargo, algunas otras xantofilas, como la luteína, se ubican de manera paralela al  $\beta$ -caroteno y están sumergidas dentro de la membrana lipídica. [2]

Varios grupos fúngicos poseen la habilidad de producir altos niveles de isoprenoides y terpenoides incluyendo carotenoides. Una variedad de isoprenoides son sintetizados por plantas incluyendo isoprenoides más complejos los cuales han sido detectados en hongos. Las plantas no son usadas normalmente para producciones a gran escala de carotenoides dado la baja tasa de crecimiento, baja cantidad disponible para la industria de pigmentos y variación estacional en la expresión de compuestos de interés. [2]

### 3.1.2. Vías metabólicas de carotenoides en hongos

La síntesis de carotenoides en hongos se produce generalmente a partir del pirofosfato de geranylgeraniol (GGPP). El GGPP se sintetiza tras cuatro pasos consecutivos de condensación a partir de un precursor de cinco átomos de carbono, el pirofosfato de isopentenilo (IPP). Este compuesto se sintetiza en diferentes organismos mediante dos rutas biosintéticas diferentes. La primera deriva del hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) a través del mevalonato, y la segunda, de la condensación de la hydroxietil-tiamina y el gliceraldehído 3-fosfato, con la D-1- deoxixilulosa 1-fosfato como intermediario. En los casos investigados, la síntesis de carotenoides en los hongos ocurre a través de la ruta del mevalonato [37][38]. En la figura 3.5 se puede observar un esquema simplificado de las vías metabólicas para producción de carotenoides en plantas, hongos y bacterias, donde *MEP* indica la vía metileritritol fosfato y *MVA* indica la vía del mevalonato o ruta del ácido mevalónico.

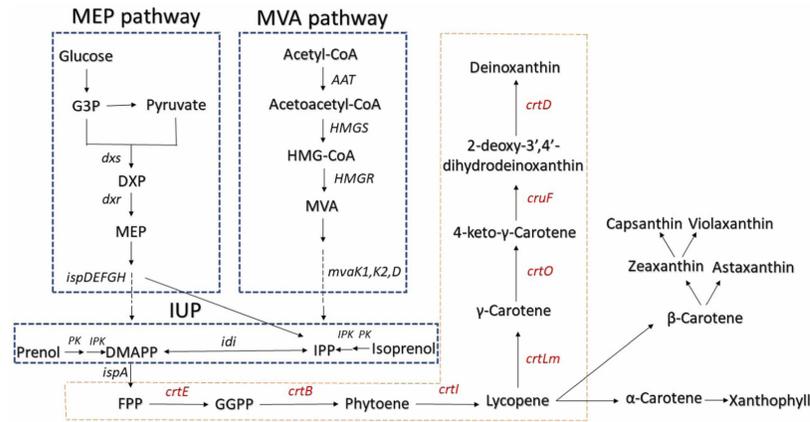


Figura 3.5: Esquema simplificado de vías metabólicas para producción de carotenoides en plantas, hongos y bacterias. [38]

La vía de la carotenogénesis fúngica evolucionó a partir de las arqueobacterias y los pasos iniciales implicados en la síntesis de las moléculas precursoras dependen únicamente de la vía *MVA*, similar a la de las arqueas. En los pasos posteriores de la vía biosintética intervienen la fitoeno sintasa (*crtB*) específica de los hongos y un gen de fusión fitoeno sintasa licopeno ciclasa [39].

La síntesis de fitoeno, como precursor de todo carotenoide en hongos implica genes de fitoeno desaturasa. Los genes de la fitoeno desaturasa fúngica han sido caracterizados en hongos como *Neurospora crassa* como *al-1* y *P. blakesleanus* con el nombre de *carB*. Los productos finales de los genes fitoeno desaturasa fúngicos difieren según las distintas clases de hongos. El gen *carB* o fitoeno deaturasa, está asociado con la acumulación de licopeno en *P. blakesleanus* y el gen (*al-1*) está implicado en la acumulación de toruleno en *N. crassa*. La síntesis de  $\beta$ -caroteno a partir de fitoeno se puede producir por el gen de fusión fitoeno sintasa (*carB*) y licopeno ciclasa (*CarRA*) en hongos como *F. fujikuroi* y mediante el gen *crtYB* en *X. dendrorhous*, en síntesis, las vías de producción de carotenoides a partir de fitoeno como precursor puede estar regulada por más de un gen. [38][39]

## 3.2. Otros pigmentos de origen fúngico

Junto con los carotenoides, los hongos poseen otros pigmentos y metabolitos secundarios que le dan su coloración y distintas propiedades, como lo son los policétidos como melaninas, azafilonas, quinonas, flavinas, monascinas, benzoquinonas ect. las cuales les pueden conferir una amplia gama de colores en el espectro visible, dado que absorben luz entre los 250 y 400 (nm) de longitud de onda, en comparación con los carotenoides que absorben luz en un rango menor entre 400 y 500 (nm). Las demás moléculas que confieren pigmentación a los hongos pueden tener distinta polaridad, estructura molecular y por lo tanto distintas propiedades físicas. Sin embargo tienen en común, con los carotenoides, que son metabolitos secundarios resultado de estrés abiótico y biótico [40]. En la figura 3.6 se puede observar un esquema con la estructura molecular de diferentes pigmentos fúngicos anteriormente mencionados y su respectiva coloración.

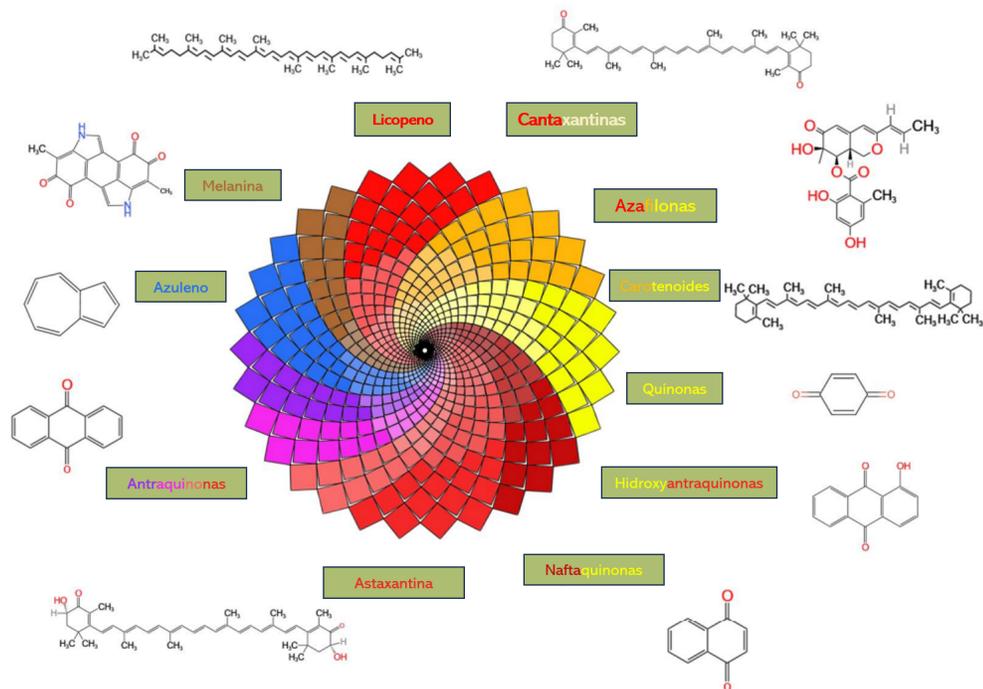


Figura 3.6: Pigmentos fúngicos (carotenoides y policétidos) junto con su coloración y estructura química. Obtenido de [40]

A diferencia de los carotenoides, los policétidos están contruidos en base a tetracétidos y octocétidos que contienen 8 unidades C<sub>2</sub>, las cuales se unen generando así una cadena policétida. Varios hongos filamentosos del género ascomiceto producen una gran cantidad de pigmentos policétidos y por otra parte también se ha reportado que producen pigmentos amarillos como riboflavinas las cuales son solubles en agua o tienen una mayor polaridad, en comparación con carotenoides [40].

Dentro de el grupo de quinonas, se han investigado algunos de estos pigmentos por sus propiedades terapéuticas en la salud humana, entre ellas se destaca la emodina o 1,3,8-trihidroxy-6-methylantraquinona, como se puede observar en la figura 3.7, la cual se puede encontrar tanto en plantas como hongos de tipo *Penicillium* y *Aspergillus* como un metabolito secundario que confiere protección ante estrés abiótico. Su estructura consiste en un anillo de antraceno con dos grupos cetona que se encuentran en el carbono 9 y 10. Se ha usado ampliamente en la medicina tradicional China y hoy en día se estudia por sus propiedades anticancerígenas, neuroprotectoras, antidiabéticas, antioxidantes y antiinflamatorias [40][41].

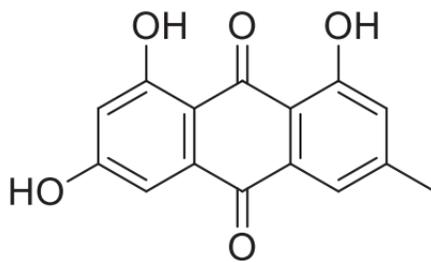


Figura 3.7: Estructura química de emodina [41]

### 3.3. Extracción de carotenoides

Antes de hacer una extracción de carotenoides, primero se debe considerar las propiedades químicas y físicas de la sustancia que se quiere extraer desde la materia prima o biomasa. La gran mayoría de las extracciones están basadas en la solubilidad del compuesto de interés así como también el estado de la biomasa a extraer, sea con contenido de agua o deshidratada.[32]

Los carotenoides son solubles en solventes apolares, incluyendo aceites comestibles, generalmente se extraen de la biomasa con solventes orgánicos con bajo punto de ebullición como cloroformo, acetona y petróleo éter dado que es común la reducción o completa evaporación de los solventes utilizados para cuantificaciones posteriores. Por otro lado también existen carotenoides de naturaleza más polar, los cuales son extraíbles con solventes orgánicos como etanol y acetato de etilo. La muestra o tejido vegetal/microbiano puede contener una gran cantidad de agua, por lo tanto también solventes orgánicos miscibles en agua, como alcohol etílico, se pueden utilizar para extracciones. El método de extracción se escoge dependiendo de la naturaleza de la muestra, la facilidad de extracción con el solvente, las propiedades y cantidad del compuesto extraído y estabilidad de los carotenoides ante solventes, teniendo en cuenta su sensibilidad a temperaturas altas, acidez, alcalinidad y oxígeno.[32][42]. En la tabla 3.1 se tiene los solventes orgánicos más utilizados para extracción de carotenoides, propiedades de polaridad junto con el punto de ebullición y ventajas o desventajas de escogerlo para ejecutar un protocolo de extracción.

Tabla 3.1: Propiedades de algunos solventes utilizados en extracción de carotenoides. Obtenido de [3].

Disolvente	Polaridad	Punto de ebullición(C°)	Ventajas	Desventajas
Acetona	Polar	56	Penetra bien en matrices alimentarias, disuelve bien carotenoides y xantófilas, facilita partición a un disolvente apolar	-
Metanol	Polar	65	Penetra bien en matrices alimentarias	
Acetato de etilo	Polaridad media	77	-	-
Hexano	No polar	69	Buen disolvente para carotenoides	Neurotóxico, no apropiado para xantófilas
Éter de petróleo	No polar	35-60	Equivalente a hexano, Buen disolvente para carotenoides apolares	
Etanol	Polar	79	Penetra bien en matrices alimentarias, poco riesgo a la salud	
Tetrahidrofurano	Polaridad media	66	Disuelve bien carotenoides y xantófilas	Acumula peróxidos

A pesar de que la extracción con solventes orgánicos sigue siendo uno de los métodos más simples y fáciles a pequeña escala de laboratorio, no existe un solo protocolo para extracción de carotenoides de todo tipo de biomasa, como se puede observar en la figura 3.8 el cual es un resumen visual obtenido de [32] de avances en la producción y extracción de

carotenoides, en el cual se enfatizan los protocolos novedosos como extracción con disolventes verdes, extracción enzimática, extracción por ultrasonidos o microondas extracción asistida por ultrasonidos o microondas, extracción con fluidos supercríticos, extracción por presión y extracción con campos eléctricos pulsados. Generalmente la metodología de extracción y uso de solventes depende bastante de que tipo de carotenoides se desea obtener y consiguiente caracterización. En el caso específico de extracción de carotenoides desde hongos y levaduras, las estrategias a utilizar dado la naturaleza propia de la biomasa, se pueden dividir en: Extracción química directa con solventes, disrupción mecánica de la pared celular y digestión enzimática de la pared celular.[2][43]

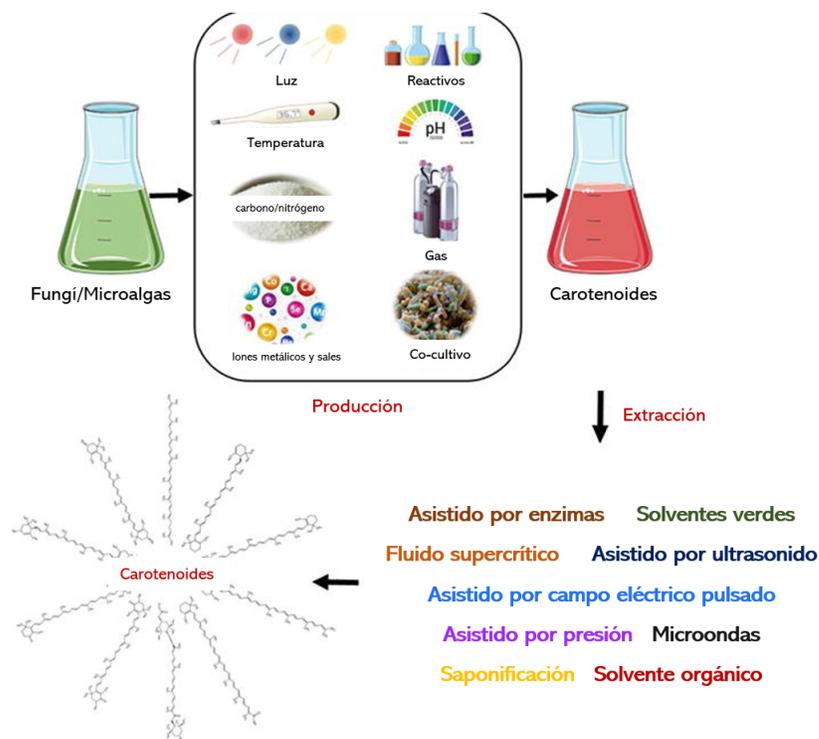


Figura 3.8: Métodos novedosos de producción y extracción de carotenoides desde algas y hongos. Figura obtenida de [32]

Para la extracción de carotenoides desde hongos, el métodos extractivo de preferencia para muestras pequeñas incluyen ruptura física de las esporas o micelio, lo que facilita la salida de carotenoides citoplasmáticos, seguido de una extracción con una mezcla o solo un solvente. Generalmente la extracción con solvente se repite hasta que no se obtiene más pigmento o el material de cual se extrae no presenta color. La disrupción de las esporas o micelio es crítica en los estudios de pigmentos citoplasmáticos, ya que la pared de la espora o células fúngicas actúa como una barrera física para la extracción de material intracelular, incluso para la extracción de células bacterianas. Dentro de los métodos físicos más efectivos reportados se encuentran el uso de distintos tipos de molinos para preparación de la muestra seca o húmeda macerada junto con el solvente, uso de esferas de cristal durante periodos de maceración y extracción junto a un agitador (bead-beater) y homogenizadores. Estas técnicas se han aplicado a una amplia gama de células resistentes, desde tejidos vegetales y animales hasta

esporas microbianas.[2][43]

Una extracción completa de carotenoides no siempre se logra con el uso de solo solventes apolares o polares por separado. Para optimizar y simplificar los protocolos de extracción y combinar las ventajas de los solventes de distinta polaridad, se puede utilizar una mezcla de ambos, por ejemplo acetona y petróleo éter en proporción (4:1,v:v) utilizado en la optimización de extracción de pigmentos de *Cordyceps militaris*, logrando el mayor rendimiento de extracción de carotenoides en comparación con otros solventes utilizados también una combinación de (3:1,v:v) de la misma mezcla para extracción de *Puccinia graminis urediniospora* extrayendo licopeno,  $\gamma$  y  $\beta$  - caroteno [44]. Finalmente, la biomasa, dentro del periodo de extracción, debe permanecer en contacto con los solventes para liberar la mayor cantidad de carotenoides de la matriz biológica pero lo suficiente para no generar isomerización y degradación de carotenoides, se reporta que alrededor de 15 minutos de maceración es suficiente para generar la mayor cantidad de extracto sin poner en riesgo la integridad de los compuestos extraídos. [33]

### 3.4. Fuentes de carotenoides en hongos

Como los productos de origen natural están atrayendo la atención de los consumidores y a su vez de la industria alimenticia, los carotenoides de fuentes microbiológicas han recibido una creciente consideración. Varias especies de hongos pueden sintetizar y acumular altas cantidades de carotenoides intracelular, por ejemplo, especies de hongos zygomyceto, **ascomyceto** basidiomyceto y deuteromiceto producen grandes cantidades de carotenoides comparado con otros organismos[39][45]. Algunos de los hongos comúnmente empleados son:

- ***Blakeslea trispora***: Es un hongo filamentoso de la división zygomycota. La producción industrial de  $\beta$  -caroteno y licopeno de fuentes fúngicas se centra principalmente en este hongo por su capacidad de síntesis de carotenoides y a su vez la habilidad de crecer bien en fermentaciones estándar de medio líquido, el contenido de  $\beta$  -caroteno se ha reportado con un máximo de 20% por peso seco de micelio o 17 (mg/g) y contenidos de licopeno pueden llegar a 41(mg/g) por peso seco del hongo [45] Mediante optimización de carotenogenesis las cantidades pueden ser aun mas altas [12]. Las fuentes de carbono principales son glucosa y desechos industriales de agricultura como varios tipos de granos, suero de leche y melaza de caña.[46]
- ***Xanthophyllomyces dendrorhous***: o también conocido como *Phaffia rhodozyma*, es una levadura de coloración rojiza, la cual puede crecer en varias fuentes de carbono como residuos industriales. La astaxantina es un carotenoide de alto valor industrial para farmacéutica, cosméticos y suplementos, esta levadura puede llegar a producir >10 (mg/g) de astaxantina por peso seco de micelio [47]. Sus fuentes de carbono se centran principalmente en glucosa, melaza de caña y subproductos de la maceración del maíz.[48]

Otros hongos ampliamente explorados por sus capacidades para producir carotenoides en altas cantidades con distintas fuentes de carbono son:

- ***Sporidiobolus pararoseus***: Es una levadura roja basidiomicota. Se reporta un rendimiento de 181 ( $\mu$ g/g) de carotenoides fermentado en fuentes de carbono como glicerol, agua de arroz y licor de maíz fermentado.[49]

- ***Rhodosporium torulooides***: Es una levadura roja que puede llegar a generar concentraciones de 481,92 ( $\mu\text{g/g}$ ) de torularodina y 501 ( $\mu\text{g/g}$ ) de toruleno por gramo de peso seco de micelio en medios con única fuente de carbono residuos de te hidrolizados.[32].
- ***Neurospora crassa***: Es un Hongo filamentoso Ascomiceto cuyas esporas presentan coloración amarillo y con alto contenido de licopeno,  $\beta$  -caroteno y cantaxantina, mediante optimización de cultivo se reportan cantidades de 140 ( $\mu\text{g/g}$ ) de peso seco en medios con sucralosa [50].
- ***Rhodotorula murcilaginosa***: Es un geno de levadura común el cual produce principalmente  $\beta$  -caroteno, toruleno y torularodina, el rendimiento máximo reportado puede llegar a 35 (mg/g)de carotenoides por peso seco de micelio con única fuente de carbono Lactosa a 13,2 (g/L) en cultivo[51].

En la tabla 3.2 se puede observar una resumen de los hongos y fuentes de carbono más rendimiento de carotenoides por peso seco de hongo anteriormente mencionados.

Tabla 3.2: Tabla resumen de Hongos con su respectivo rendimiento de carotenoides optimizado y fuentes de carbono utilizadas en la fermentación. Elaboración propia.

Hongo	Rendimiento carotenoides (optimizado)	Fuentes de carbono utilizadas	Referencia
<i>Blakeslea trispora</i>	17 (mg/g) $\beta$ -caroteno y 41 (mg/g) Licopeno	Carbohidratos, aceites vegetales, melaza de caña de azucar	[45][46]
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	>10 (mg/g) Astaxantina	Melaza, maíz, jugo de uva,	[48]
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	181 ( $\mu\text{g/g}$ ) Carotenoides	Glicerol, agua de arroz, licor de maíz fermentado	[49]
<i>Rhodosporium torulooides</i>	481,92 ( $\mu\text{g/g}$ ) Torularodina, 501 (ug/g) Toruleno	Residuos de te hidrolizados	[32]
<i>Neurospora crassa</i>	141,1 ( $\mu\text{g/g}$ ) Carotenoides	Sucralosa	[50]
<i>Rhodotorula murcilaginosa</i>	35,0 (mg/g) Carotenoides	Lactosa	[51]

Para los estándares industriales, los carotenoides deben ser estables en un amplio rango de pH y temperatura. Los pigmentos fúngicos pueden soportar pH y temperaturas extremos. Los pigmentos derivados de, por ejemplo, *Isaria farinosa*, *Fusarium verticillioides*, etc. son estables en entornos ácidos o de ph equivalente a 5, los pigmentos derivados de *Thermomyces* muestran estabilidad en entornos ácidos a moderadamente alcalinos que van de pH (5,10 - 8,00), y los pigmentos derivados de *Penicillium aculeatum*, que se utilizan en bebidas no alcohólicas, son estables en condiciones neutras. Los pigmentos derivados de *Isaria spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.* y *Emericella spp.* que se utilizan para el teñido del cuero precurtido muestran estabilidad a temperaturas extremadamente altas.[32][52]

Es importante recalcar que la síntesis de carotenoides por fermentación puede convertirse en una opción asequible si el coste de producción puede ser minimizado por el uso de subproductos industriales de bajo costo y también con el desarrollo biotecnológico de las especies a utilizar. El proceso de biosíntesis de carotenoides por hongos tiene un ciclo corto y al mismo tiempo puede producir mediante fermentación continua, es fácil de reciclar, no se ve afectado por el clima y los subproductos, como el sobrenadante de fermentación, es rico en moléculas como proteínas, aminoácidos, grasas y carbohidratos los cuales pueden desarrollarse y aplicarse consiguientemente a la industria.[32]

### 3.5. Fuentes de interferencia en identificación de carotenoides

En la identificación de carotenoides, pueden surgir algunas fuentes de interferencia que dificultan la detección precisa y la caracterización adecuada de estos compuestos. Estas dificultades están dadas generalmente por la inestabilidad propia de los carotenoides y sus características estructurales de doble enlace conjugado. En particular, son sensibles a la luz, el oxígeno, los ácidos, las bases y las altas temperaturas. Por lo anterior es necesario ejecutar medidas preventivas en su extracción, manipulación y consecuentemente en su caracterización. [2][53]

Algunas de las posibles interferencias incluyen la degradación y transformación de los pigmentos en isómeros *cis* o *trans* o fragmentación de los mismos por su sensibilidad al ambiente, dificultando su caracterización o haciéndola inexacta. Medidas preventivas en la fase de extracción, incluyen trabajo en un periodo de tiempo acotado, evitar contacto con luz, oxígeno y calor por sobre los 25 °C. Para la biomasa de la cual se extraen pigmentos, de estar homogenizada por medios físicos puede liberar enzimas como lipoxigenasas o peroxidasas que favorecen la oxidación, por lo tanto, también deben estar alejadas de la luz y fuentes de calor.[3][33]

La presencia de otros compuestos derivados de la biomasa de la cual se extraen carotenoides presentes en la muestra a analizar, como lípidos o proteínas, pueden afectar la separación y detección de carotenoides por métodos derivados de la cromatografía. En la fase de identificación y cuantificación, es probable que ocurra esterificación de los carotenoides por ácidos grasos, además, el grado de esterificación puede ser diferente dependiendo del número de hidroxilos presentes en la estructura del carotenoide, dando como resultado dificultades al momento de identificar peaks en métodos como HPLC, para esto se agrega una fase de saponificación a la extracción con sustancias alcalinas lo cual ha reportado degradación del contenido total de carotenoides, dependiendo de la muestra y el protocolo utilizado. En biomasa con bajo contenido de lípidos es preferente no usar la fase de saponificación dado que es posible determinar carotenoides en su estado libre o esterificado.[3] [53]

### 3.6. Biomasa proveniente de algas

La demanda de biomasa de algas marinas para las industrias de hidrocoloides y de productos novedosos para los sectores alimentario, farmacéutico, cosmético y agroindustrial no ha dejado de aumentar en la última década. Se espera que esta tendencia continúe en el futuro, a medida que se descubran nuevos usos y las necesidades cada vez mayores de la población humana de productos sanos y energía limpia se amplíen más allá de los recursos terrestres. El cultivo de algas sigue enfrentándose a limitaciones para su desarrollo y una de ellas es su rentabilidad económica, ya que en general la biomasa de algas tiene un valor bastante bajo, con pocas excepciones de algunas especies utilizadas para el consumo humano.[7]

### 3.6.1. *Durvillaea antarctica*

El alga parda *D. antarctica* o localmente conocida como Cochayuyo es un alga comestible, rica en yodo y que habita costas sub antárticas en las zonas de Chile, Nueva Zelanda y el océano atlántico sur, llegando a medir 15 metros. El alga es uno de los recursos alimenticios de comunidades indígenas americanas durante siglos, hoy en día forma parte de la gastronomía chilena[54].

La cosecha de esta alga es principalmente artesanal por pescadores chilenos y su extracción es durante todo el año con un mayor rendimiento de octubre hasta febrero. Se comercializa en empaques previamente secados y se utiliza para gastronomía chilena. Su importancia nutritiva y disponibilidad estacional la hacen deseable en el mercado alimenticio como fuente de alginato en el mercado asiático junto con componentes como aminoácidos, pigmentos como clorofila y carotenoides, vitamina E, fenoles y actividad antioxidante. En la tabla 3.3 se puede apreciar un estudio de sus principales pigmentos y correlación con temperatura de secado, en específico la columna carotenoides hace referencia a contenido total no especificado.[55]

Tabla 3.3: Clorofila, carotenoides y vitamina E en alga parda *D. antarctica* por peso seco (ps) de alga deshidratada a diferentes temperaturas [55]

Temperatura C°	Pigmentos (mg/kg ps)			Tocoferol (mg/kg ps)
	Clorofila a	Clorofila c1 + c2	Carotenoides	$\alpha$ -tocoferol (Vit e)
Control	698.6 $\pm$ 5.3	108.3 $\pm$ 2.6	34.1 $\pm$ 1.70	84.0 $\pm$ 0.5
40	438.0 $\pm$ 2.0	58 $\pm$ 2.2	23.1 $\pm$ 1.95	100.3 $\pm$ 17.2
50	606.3 $\pm$ 7.7	93.5 $\pm$ 4.4	35.9 $\pm$ 1.27	65.8 $\pm$ 8.0
60	412.0 $\pm$ 20.3	62.7 $\pm$ 3.2	32.9 $\pm$ 1.27	78.1 $\pm$ 11.4
70	499 $\pm$ 21.4	76.7 $\pm$ 1.5	35.4 $\pm$ 1.83	83.4 $\pm$ 1.8
80	483.9 $\pm$ 5.7	72.3 $\pm$ 1.5	28.9 $\pm$ 1.14	89.0 $\pm$ 4.4

### 3.6.2. *Macrocystis pyrifera*

El alga *Macrocystis pyrifera* es un alga parda gigante que habita las costas del pacifico de América del norte así como en las costas de los mares del sur como sudamérica, sudafrica, Australia y Nueva Zelanda, su hábitat es cercana a la superficie hasta 30 metros de profundidad y puede llegar a formar bosques submarinos, también pueden llegar a alcanzar 45 metros y el principal producto que se obtiene de esta alga es el ácido algínico, el cual se usa como espesante y emulsionante en producción de una amplia gamma de alimentos y no suele consumirse directamente. La cosecha de está alga constituye una parte no despreciable del total de desembarques variando su precio y no superando el dólar por kilogramo de alga seca.[6][7]

Aproximadamente un 50% del peso seco de *M. pyrifera* corresponde a distintos tipos de azúcares, los cuales pueden ser transformados en etanol y otros biocombustibles. También dentro de su composición se pueden encontrar proteínas y moléculas bioactivas como floroglucinol y fucoxantina. Aparte de sus usos para producción de alginato, también se usa para la alimentación de abalones. En la tabla 3.4 se puede observar concentraciones de diferentes pigmentos del alga cosechada a distintas profundidades en las costas de Baja California, Mé-

xico, con aguas en temperaturas aproximadas a 15,5°C en superficie y 13°C a 9 metros de profundidad [7][56]. Se destaca las cantidades de carotenoides como fucoxantina,  $\beta$ -caroteno, violaxantina y anteraxantina por su interés comercial e importancia en la dieta humana [3].

Tabla 3.4: Concentración de pigmentos de hojas de *M. pyrifera* por gramo de peso seco recogidos a distintas profundidades.[56]

Profundidad (m)	Concentración de pigmentos ( $\mu\text{g/g}$ )						
	Clorofila C	Clorofila A	Fucoxantina	$\beta$ -caroteno	Violaxantina	Anteraxantina	Zeaxantina
0	270 $\pm$ 120	2080 $\pm$ 380	1090 $\pm$ 220	250 $\pm$ 70	440 $\pm$ 150	36 $\pm$ 25	14 $\pm$ 11
3	340 $\pm$ 170	2630 $\pm$ 740	1400 $\pm$ 430	260 $\pm$ 110	320 $\pm$ 170	12 $\pm$ 9	5 $\pm$ 5
6	290 $\pm$ 170	2060 $\pm$ 540	1160 $\pm$ 430	180 $\pm$ 80	200 $\pm$ 90	5 $\pm$ 2	4 $\pm$ 3
9	450 $\pm$ 190	2970 $\pm$ 710	2080 $\pm$ 910	330 $\pm$ 150	280 $\pm$ 140	4 $\pm$ 1	1 $\pm$ 2
12	490 $\pm$ 160	2980 $\pm$ 290	2060 $\pm$ 120	290 $\pm$ 40	260 $\pm$ 30	3 $\pm$ 0	1 $\pm$ 2
13.5	450 $\pm$ 200	2820 $\pm$ 130	2000 $\pm$ 120	290 $\pm$ 20	220 $\pm$ 30	3 $\pm$ 1	ND
18	450 $\pm$ 440	2960 $\pm$ 900	2290 $\pm$ 100	280 $\pm$ 130	240 $\pm$ 100	2 $\pm$ 1	ND

### 3.7. *Asteromyces cruciatus*

Los hongos filamentosos, particularmente los marinos, son ampliamente reconocidos como una fuente emergente de metabolitos secundarios novedosos, lo cual es corroborado por conocimientos obtenidos de proyectos de secuenciación de genoma fúngico. Los estudios atribuyen a los hongos filamentosos marinos capacidades biosintéticas para la producción de metabolitos secundarios, entre ellos, carotenoides.[1]

El hongo filamentoso marino *Asteromyces cruciatus*, reino fungi, subreino dinarya de la división ascomycota y genus asteromyces, aun es un campo inexplorado químicamente, pero presenta una nueva fuente de metabolitos secundarios y entre ellos carotenoides. Dado pruebas en fermentación con glucosa en los laboratorios de CeBiB, se estima que podría poseer genes asociados a la producción de carotenoides dado la coloración visible presente en el medio de cultivo y micelio, como se puede observar en la figura 3.9. Por lo tanto, carotenoides de interés industrial podrían ser obtenidos a partir del hongo *Asteromyces Cruciatus* cultivado en medios cuya única fuente de carbono son las algas pardas.

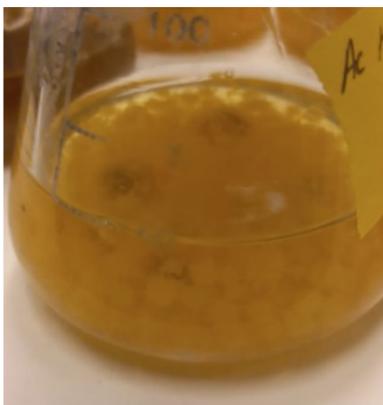


Figura 3.9: *Asteromyces cruciatus* cultivado en un medio de agua de mar artificial al 2% de salinidad con glucosa en concentración 20 (g/L). Laboratorios del CeBiB.

## 3.8. Métodos de caracterización

### 3.8.1. Espectrofotometría

La espectrofotometría es un método en el cual se mide la cantidad de luz que puede absorber una sustancia química dentro de una muestra cuando un haz de luz atraviesa la muestra que contiene dicha sustancia. El principio básico es que cada componente absorbe o transmite luz en un cierto rango de longitudes de onda. La medición también puede ser usada para conocer la cantidad de cierta sustancia química ya identificada basándose en la ley de Beer-Lambert. La espectrofotometría es uno de los métodos más útiles de análisis cuantitativo en diversos campos como la química, la física, la bioquímica, la ingeniería química y de materiales y las aplicaciones clínicas.[57]

En relación a las muestras a identificar, se pueden utilizar dos tipos:

- **UV-visible spectrophotometer:** Su rango de medición va por sobre el rango ultravioleta o de 185 - 400 (nm) y el rango visible, de 400 - 700 (nm) en el espectro de radiación electromagnética.[3]
- **IR spectrophotometer:** Usa luz por sobre el rango infrarrojo de el espectro de radiación electromagnética o entre 700 - 1500 (nm).[3]

La mayoría de carotenoides exhiben una absorción en la región visible del espectro, principalmente entre 400 y 500 (nm). La absorción en el rango descrito se debe a la extensión del sistema de dobles enlaces conjugados en los carotenoides. La parte insaturada conjugada del carotenoide, el cual contiene electrones  $\pi$  deslocalizados se denomina cromóforo y es responsable de la absorción de luz en el espectro visible, las diferencias en la absorción de los distintos carotenoides esta dada por sus diferencias moleculares y por lo tanto son de gran importancia para su identificación. Por otro lado, existe la posibilidad de tener una cantidad de carotenoides diferentes con el mismo espectro, como es el caso de  $\beta$ -caroteno y Zeaxantina que poseen cromóforos idénticos o también el caso de solapamientos de espectros de absorción como se puede observar en la figura 3.10 el cual muestra el espectro de absorción de Clorofila a, Clorofila b y  $\beta$ -caroteno.[3][29]

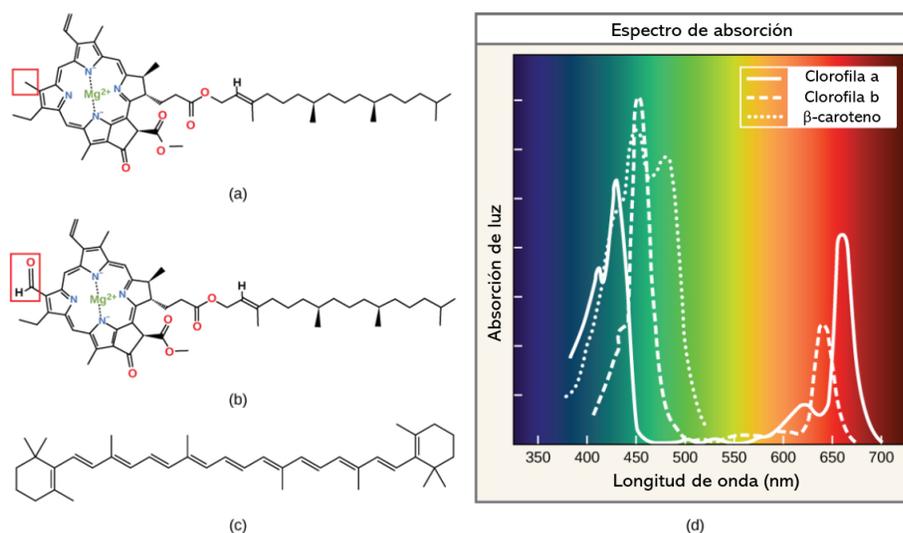


Figura 3.10: Espectro de absorción de: Clorofila a (a), Clorofila b (b) y  $\beta$ -caroteno (c) [58]

Los métodos de cuantificación se basan en gran medida en las propiedades de absorción de los pigmentos, la absorción máxima o  $\lambda_{max}$  indica la longitud de onda en el cual el pigmento absorbe la mayor cantidad de luz dentro de todo su espectro. Por ejemplo  $\beta$ -caroteno tiene una absorción máxima en 450 (nm) con solventes como hexano y acetona, mientras que licopeno presenta una absorción máxima en 470[nm] en hexano [43]. En la tabla 3.5 se puede observar carotenoides comunes y su absorbancia máxima con distintos solventes orgánicos, es importante recalcar que, los distintos  $\lambda_{max}$  dependiendo del carotenoide y solvente en el que se encuentra puede presentar error de 2 a 3 (nm) entre distintas fuentes bibliográficas.[3][33]

Tabla 3.5: Datos de Absorbancia UV-Visible de carotenoides comunes en distintos solventes obtenidos de [33]

Carotenoide	Solvente	$\lambda_{max}$ (nm)		
$\alpha$ -caroteno	Acetona	424	448	476
	Cloroformo	433	457	484
	Etanol	423	444	473
	Hexano, petróleo éter	422	445	473
$\beta$ -caroteno	Acetona	429	452	478
	Cloroformo	435	461	485
	Etanol	425	450	478
	Hexano, petróleo éter	425	450	477
Zeaxantina	Acetona	430	452	479
	Cloroformo	433	462	493
	Etanol	428	450	478
	Petróleo éter	424	449	476
$\alpha$ -criptoxantina	Cloroformo	435	459	487
	Etanol	423	446	473
	Hexano	421	445	475
$\beta$ -criptoxantina	Cloroformo	435	459	485
	Etanol	428	450	478
	Petróleo éter	425	449	476

Dado que los carotenoides obedecen la ley de Beer-Lambert, como se puede ver en la ecuación 3.1 que estipula que la absorbancia es linealmente proporcional a la concentración, las medidas de absorbancia máxima pueden utilizarse para la cuantificación de concentración pura o para estimar el contenido total de carotenoides en una muestra de extracto. Para esto se utilizan coeficientes de extinción, definidos como la relación entre la intensidad de la luz absorbida y la concentración de la sustancia que absorbe dicha luz, junto con la distancia de la muestra, se suele representar con el símbolo  $\epsilon$  y tiene medidas de ( $Lmol^{-1}cm^{-1}$ ). Sabiendo el coeficiente de extinción, los cuales se pueden encontrar en la literatura, se puede conocer el valor de concentración. Analogamente y por literatura, también se pueden obtener coeficientes de absorción ( $A_{1cm}^{1\%}$ ) para distintos solventes con lo cual se puede calcular el contenido de carotenoides. El coeficiente de absorción se define como la absorbancia en una longitud de onda determinada de una solución al 1% de concentración en una cuveta a 1(cm) de distancia. En la tabla 3.6 se puede observar algunos de los coeficientes de extinción y absorción que se pueden utilizar para cuantificación dado los solventes en los cuales se encuentran diluidos los carotenoides. [29][57][33]

## Ley de Beer - Lambert

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (3.1)$$

Donde:

- A es la absorbancia medida de la muestra
- $\epsilon$  es el coeficiente de extinción
- l es la distancia de la muestra
- c es concentración

Tabla 3.6: Tabla resumen de coeficientes de extinción y de absorción para carotenoides con su respectivo solvente. Obtenido de [59][33].

Carotenoide	Coef extinción a 450(nm) ( $\frac{ml}{mg \cdot cm}$ )	Coef extinción	Coefficiente absorción $A_{1cm}^{1\%}$
Luteína	215/etanol	255/etanol , 445(nm)	2550/etanol, 445(nm)
Zeaxantina	192/etanol	234/acetona , 452(nm)	2340/acetona, 452(nm)
$\alpha$ -caroteno	260/acetona	270/acetona , 448(nm)	2800/petroleo éter, 450(nm)
$\beta$ -caroteno	233/acetona	250/acetona, 454(nm)	2592/petroleo éter, 450(nm)
Carotenoides (general)	-	-	2500/mix solventes, 450(nm)

### 3.8.2. HPLC y UHPLC-QTOF

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación que utiliza los principios básicos de la cromatografía líquida, separación basada en la interacción del analito entre una fase líquida móvil y una fase estacionaria. En este tipo de cromatografía, el líquido que compone la fase móvil se bombea mecánicamente a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Así, un equipo de HPLC consiste en bomba mecánica, controlador y detector, equipos entre los que se intercala la columna cromatográfica en la que se realiza la separación y el conjunto está controlado por un software de gestión del sistema cromatográfico, adquisición de datos y posterior análisis de los mismos.[3]

El método de análisis requiere una etapa de purificación de las muestras a analizar antes de su inyección en el sistema HPLC con tal de eliminar posibles interferencias, como partículas provenientes de la muestra extraída. Esta etapa puede usar técnicas como filtración o centrifugación[3][2].

Los tiempos de retención encontrados para una muestra son identificables mediante la comparación con muestras estándar de carotenoides en solventes específicos. Por lo tanto para identificar y cuantificar con HPLC se debe comparar con muestras estándar de carotenoides en un solvente específico y concentración conocida. [3]. En la figura 3.11 se puede observar un gráfico resultante de una muestra de carotenoides del hongo *P. Rhodozyma*, los tiempos de retención obtenidos son 11,81 (min) para licopeno, 15,61 (min)  $\beta$ -caroteno y 6,71 (min) detectados a 473(nm) de longitud de onda. Más detalles sobre la identificación y fase móvil utilizada se pueden encontrar en la tabla 3.7 junto con más protocolos de HPLC para distintos hongos y tiempos de retención obtenidos. Para la caracterización de carotenoides, los tiempos de retención de compuestos apolares es menor que en polares por lo que un peak

no identificado puede dar indicios de la naturaleza del pigmento.

Tabla 3.7: Métodos utilizados y tiempos de retención obtenidos para caracterización de carotenoides en distintos hongos.

Hongo	Método	Carotenoide y tiempo de elusión (min)	Referencia
<i>P. rhodozyma</i>	HPLC fase reversa, columna C18 Alltech Altima, fase móvil gradiente de A: 95%acetonitrilo, 5% metanol y B: diclorometano, tiempo de medición 22 minutos, detección a 473(nm).	Astaxantina (6,71), lycopeno (11,81), $\beta$ -caroteno (15,61)	[2]
<i>Blakeslea trispora</i>	HPLC con detector de diodos Finnigan UV6000LP, columna C18 Grace vydac 201 TP54 con fase móvil de metanol, medidos a 429-450-478(nm) para $\beta$ -caroteno, 444-468-501(nm) lycopeno, 440-462-492(nm) $\gamma$ -caroteno.	$\beta$ -caroteno (8,0), $\gamma$ -caroteno(9,5), lycopeno (11,0)	[60]
<i>Rhodotorula glutinis</i> / <i>X. dendrorhous</i> Car245/ <i>Sporobolomyces coprosmae</i> Car027	HPLC Hewlett-packard HP1090 Columna C18 Lichrosphere 100 RP-18 de 5(mm); 125 x 4 (mm). Equipado con un detector de arreglo de diodos, fase móvil gradiente de acetona 70% a 100% medido a 450(nm) por 20 minutos.	Astaxantina (7,5-8,4), $\beta$ -caroteno (15,8-16,3), $\gamma$ -caroteno(15,7-16,0), toruleno (15,5-15,7), torularodina (13,0-13,5)	[61]
<i>Puccinia distincta</i>	HPLC Hewlet packard 1090 series con columna C-18 LiChrospher 100 RP-18 con gradiente lineal de acetonitrilo:agua:ácido fórmico (86:10:4, v:v:v) y acetato de etilo:ácido fórmico (96:4,v:v) tiempo de medición 20 minutos medido a 450(nm).	$\gamma$ -caroteno (12,2), $\beta$ -caroteno (13)	[62]

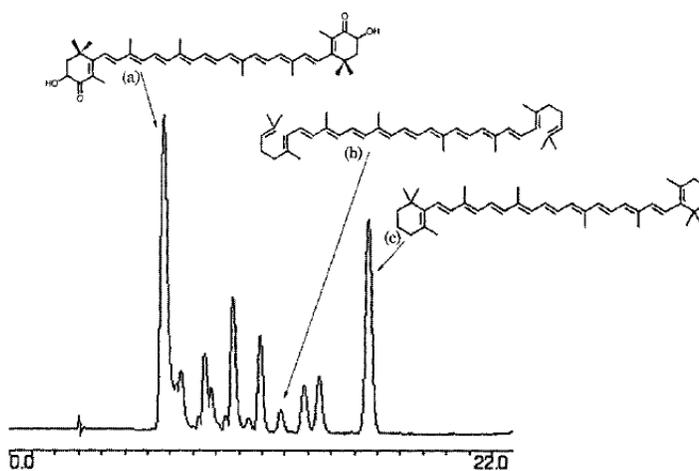


Figura 3.11: HPLC en fase reversa de una muestra de carotenoides obtenidos de *P. rhodozyma*. Astaxantina (a), lycopeno (b) y  $\beta$ -caroteno (c). [2]

El análisis de muestras concentradas pueden crear un solapamiento de los tiempos de retención de interés y por el otro lado si la muestra está muy diluida puede que no se presenten peaks para algunos carotenoides en baja cantidad. La identificación y caracterización de carotenoides desde un extracto presenta varias variables dado los distintos solventes orgánicos y polares que se puedan usar, también existe la problemática de su baja estabilidad lo que genera una diferencia en el rendimiento real y el identificado. Existe la complejidad de que para la identificación de carotenoides con HPLC, se debe calibrar a los carotenoides que se quieran encontrar con un método exacto de extracción y uso de solventes, sumado a uso de estándares de alta pureza.[3][33][63]

El análisis de carotenoides mediante UHPLC (Ultra High-Performance Liquid Chromatography) acoplado a un espectrómetro de masas QTOF (Quadrupole Time-of-Flight) es una técnica avanzada que permite una separación cromatográfica de alta resolución y una identificación precisa de los carotenoides presentes en una muestra. Después de la separación cromatográfica, los carotenoides eluidos se introducen en el espectrómetro de masas (MS) QTOF. El QTOF es capaz de medir la masa y la carga de los iones presentes ( $m/z$ ) en la muestra después de un proceso de ionización, lo que permite la identificación precisa de los carotenoides. Además, el QTOF también puede proporcionar información sobre la estructura molecular de los carotenoides a través de la fragmentación controlada de los iones en el espectrómetro. Los datos de mayor importancia en el análisis son el peso molecular del carotenoide o compuesto y patrones de fragmentación característicos de la estructura química. Dado que la cromatografía líquida solo puede identificar compuestos mediante su interacción con el espectro visible de luz, la identificación de algunos compuestos puede resultar compleja, por lo tanto la confirmación mediante técnicas (MS) que pueden medir peso molecular e ionización de fragmentos del compuesto resulta un gran avance para la identificación y cuantificación de carotenoides ya conocidos y nuevos.[33][64]

Dado que los carotenoides poseen una cadena poliénica, referente a una estructura con múltiples dobles enlaces, al ionizar el carotenoide la parte de la cadena poliénica tiene la capacidad de reorganizar y estabilizar cargas positivas y negativas en la estructura del pigmento resultando en iones estables los cuales se pueden detectar e identificar con la técnica mencionada de espectrometría de masa. Dado que existen diversas técnicas de ionización que producen diferentes patrones de fragmentación para un mismo carotenoide, se debe tener precaución en la interpretación de la información basada en bibliografía. [33][3]

La detección se basa en la identificación de el peak de masa atómica más alta correspondiente a la molécula protonada ( $[M+H]^+$ ) del carotenoide junto a su relación carga masa ( $m/z$ ) mediante estos datos se puede relacionar el peak obtenido con un carotenoide en específico. Por ejemplo y como se puede observar en la figura 3.12 en el caso de identificación de luteína y zeaxantina, ambos poseen el mismo peso molecular de 568 (g/mol) y por lo tanto en el espectro se verá  $[M+H]^+$  (569,4  $m/z$ ) como el peak de ( $m/z$ ) más alto en el eje 'x' seguido de  $[M+H-18]^+$  (551,4  $m/z$ ) en ambos espectros, sin embargo se pueden diferenciar mediante la razón de intensidad de ambos peaks. En el caso de luteína donde la razón ( $[M+H-18]^+ / [M+H]^+$ ) es mayor, implica que los grupos hidroxilos son alílicos al doble enlace del anillo mientras que en el espectro de zeaxantina presenta características opuestas. Mediante las diferencias y la relación ( $m/z$ ) se puede identificar cada carotenoide de forma precisa.[3][33]

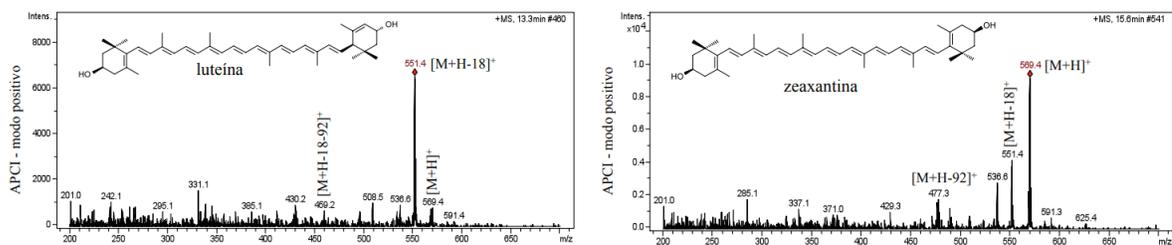


Figura 3.12: Estructuras químicas y espectros de masas de luteína y zeaxantina mostrando la fragmentación en la fuente, obtenido de [3].

# Capítulo 4

## Materiales y Metodología

En este apartado se describe detalladamente los procedimientos y métodos utilizados para llevar a cabo este estudio. Se abordarán aspectos como la selección y preparación de muestras, recolección y análisis de datos, así como las técnicas y equipos utilizados. La metodología se divide en cuatro etapas: La primera consiste en la preparación de los organismos a utilizar y biomasa, la segunda consiste en la determinación de crecimiento del hongo marino con estrés abiótico y fermentación del hongo marino con algas pardas, la tercera implica el uso de dos protocolos distintos de extracción de carotenoides de micelio de hongo marino y finalmente la última etapa consta de la cuantificación e identificación de pigmentos y carotenoides obtenidos mediante espectrofotometría, HPLC y UHPLC-QTOF. En la figura 4.1 se puede observar un diagrama de la metodología empleada

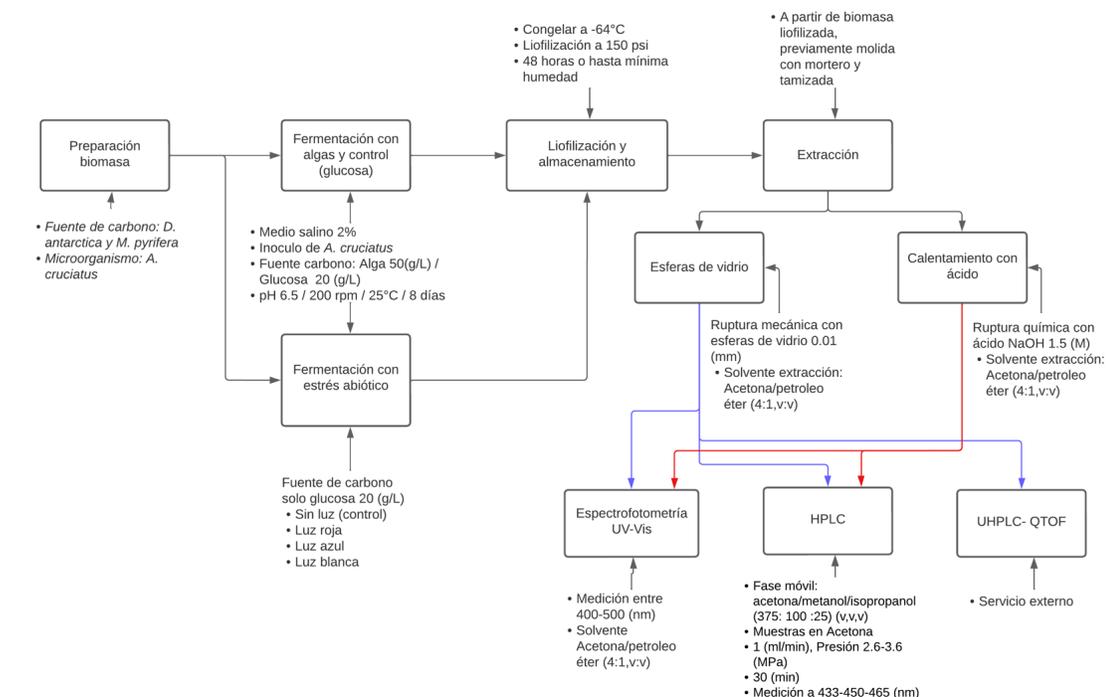


Figura 4.1: Diagrama de bloques de metodología empleada y parámetros utilizados, Elaboración propia

## 4.1. Preparación de biomasa e inóculos

### 4.1.1. Micelio de *A. cruciatus*

Para la fermentación de algas con el hongo marino, es necesario tener una cantidad adecuada de micelio disponible, por lo que se genera micelio suficiente para etapas posteriores de la metodología. Para esto, se preparan placas de petri con un medio de PDA salino en medio estéril en el cual se inserta 1 (cm<sup>2</sup>) de micelio del hongo *A. cruciatus* de un cultivo previamente establecido y entregado por CeBiB, asegurando una distribución uniforme en las placas, como se puede observar en la figura 4.2.

El medio de cultivo es preparado mezclando, en un matraz de Erlenmeyer, 10 (g/L) de NaCl, 25 (g/L) PDB, 4 (g/L) Maltosa, 2 (g/L) Peptona y 16 (g/L) Agar en agua destilada, para luego pasar por un proceso de autoclave a 121 °C.

Una vez listas las placas con el medio solidificado e inóculos, se sella en condiciones de esterilidad y se mantiene alejado de la luz a una temperatura ambiente para su incubación, se monitorea regularmente para descartar placas contaminadas con organismos no deseados. Una vez las placas presentan una proliferación adecuada en las placas de petri, se utilizan para las siguientes inoculaciones y/o proliferación de micelio, al mismo tiempo que asegurar su inventario en los laboratorios del CeBiB.



Figura 4.2: Cultivo de micelio de *A. cruciatus*, laboratorios CeBiB

### 4.1.2. Preparación de algas pardas

Las algas *Macrocystis pyrifera* fueron entregadas por CeBiB, cosechadas en Chiloé a 30 km de Puerto Montt, donadas por el profesor A. Buschman desde la Universidad de Los Lagos y el alga *Durvillaea Antarctica* proviene de Concepción, proporcionado por la empresa *Herbamar*.

Las algas pasan por un proceso de limpieza con agua destilada hasta que el agua residual de la limpieza se ve transparente, para luego pasar a un horno a 60°C donde se secan por alrededor de 48 horas o hasta que se detecte humedad mínima y constante para luego almacenar a temperatura ambiente. Para su uso se muelen con mortero hasta obtener un polvo fino, se tamiza por un filtro de 0.22 ( $\mu\text{m}$ ) y almacenan en tubos Falcon de 50 (ml) alejado de luz y humedad.

## 4.2. Fermentación

### 4.2.1. Medio de cultivo y condiciones

Para el cultivo se prepara un medio base de agua de mar artificial al 2% (p/v) NaCl el cual también contiene 2,8 (g/L)  $MgCl - 6H_2O$ , 4 (g/L)  $MgSO_4$ , 0,72 (g/L)  $KCl$ , 0,2 (g/L)  $NaHCO_3$ , 0,4 (g/L)  $CaCl$ , 16 (g/L) Agar y extracto de levadura (YNB, Yeast nitrogen base) como fuente de nitrógeno en concentración 4 (g/L). Luego se homogeniza el medio con una concentración de 50 (g/L) de alga parda como única fuente de carbono. Paralelamente se prepara el mismo medio de cultivo con única fuente de carbono 20 (g/L) de glucosa el cual se utilizara como punto comparativo, ajustando el pH a 6,5 para ambas experiencias, utilizando  $NaOH$  10 (M) para todos los medios.

Los medios de cultivo, con su respectiva fuente de carbono, algas pardas o glucosa, se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Una vez listos los medios de cultivo se inoculan con 1 ( $cm^2$ ) de micelio del hongo *Asteromyces cruciatus* por cada 50 (ml) de medio.

### 4.2.2. Fermentación de algas con hongo marino

Cada uno de los medios de cultivos preparados con las algas *Macrocystis pyrifera* y *Durvillaea antarctica* y medio de cultivo con única fuente de carbono glucosa como referencia, se fermenta con el hongo por separado, en frascos Erlenmeyer estándar de 250 (ml) con a lo menos dos replicados por experiencia y una cantidad máxima de 50 (ml) de medio de cultivo por frasco. Las condiciones de fermentación se fijan a 25 °C y una agitación de 200 (rpm) durante 8 días en ausencia de luz, revestidos con foil. Al acabar la fermentación, el hongo marino y restos de medio de cultivo son separados de forma manual, con el fin de eliminar la mayor cantidad de humedad posible evitando pérdida de biomasa, para luego pasar a tubos Falcon de 50 (ml), a una centrifugación a 12.000 (G) y 15°C durante 10 minutos donde se separa el sobrenadante de la biomasa para posteriormente congelar solo la biomasa obtenida a -80°C.

### 4.2.3. Fermentación de hongo marino con estrés abiótico

Para estudiar el efecto de diferentes longitudes de onda de la luz en el crecimiento de *A. cruciatus* en medio con única fuente de carbono glucosa, el experimento se prepara bajo el principio de que el papel celofán solo deja atravesar su propio color hacia los medios de cultivo, mientras que filtra las otras longitudes de onda. Para esto y basándose en el protocolo de Velmurugan et al. (2010) [67]. Se prepara un medio de cultivo de sal de mar artificial al 2% (p/v) con única fuente de carbono glucosa en concentración de 20 (g/L) como está descrita en la sección 4.2.1. Se preparan cuatro grupos de matraces de 250 (ml) y en triplicado cada grupo, se inocula con 1 ( $cm^2$ ) de micelio de *A. cruciatus* por cada 50 (ml) de medio de cultivo y luego se cubren como se describe a continuación: El primer grupo se mantiene sin luz cubierto con papel aluminio, actuando como grupo control, el segundo grupo no se cubre (iluminación directa), el tercer grupo se cubre con papel celofán rojo (780nm - 622nm) en 3 capas y el cuarto grupo se cubre con papel celofán azul (492 (nm) - 455 (nm)) en 3 capas. Luego, los matraces se instalan dentro de un incubador a 200 rpm y 25°C por 8 días bajo una fuente de luz. En la figura 4.3 se puede observar una descripción visual del estudio.

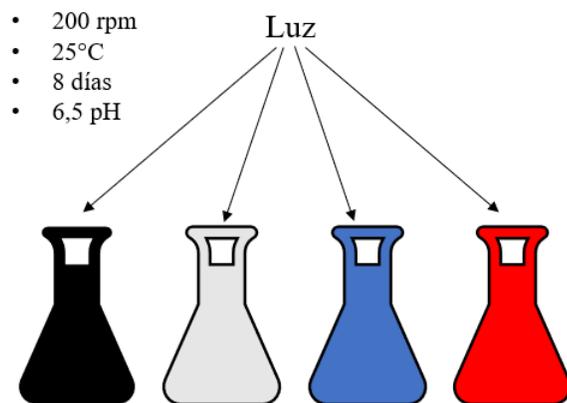


Figura 4.3: Modelo experimental de fermentación con estrés abiótico de *A. cruciatus* en medios con única fuente de carbono glucosa. El matraz negro indica sin exposición de luz, matraz blanco indica luz blanca directa del equipo, matraz azul indica luz azul y matraz rojo indica luz roja. Elaboración propia.

Una vez terminada la fermentación, se separan los restos de medio de cultivo del hongo marino cuidadosamente de forma manual y se trasvasijan a tubos Falcon de 50 (ml) previamente masados, luego de liofilizarlas, se masan los tubos con el contenido de micelio sin humedad y se registran datos donde el contenido de biomasa se calcula como el peso total del tubo junto con la biomasa liofilizada menos el peso del mismo tubo vacío.

### 4.3. Liofilización y almacenamiento de muestras

Para liofilizar el hongo marino *A. cruciatus* fermentado en medios con únicas fuentes de carbono algas pardas y paralelamente glucosa, se utiliza el liofilizador Freeze Dryer MFD-1850M (Mundolab, China). Se liofilizan las muestras a  $-64^{\circ}\text{C}$  a una presión de 150 (psi) hasta estar visiblemente secas o por 48 horas aproximadamente. Para moler las muestras se utiliza un mortero hasta obtener un polvo fino y para almacenar las muestras se utilizaron tubos Falcon de 50 (ml).

#### 4.3.1. Análisis de resultados

En el análisis de datos obtenidos, para creación y manejo de tablas de datos adquiridos y cálculo de concentraciones se utilizó el software *Excel*. Para realizar los análisis y comparación de datos se utiliza análisis ANOVA Brown-Forsythe y welch con el software *Graphpad Prism 8.0.1* en el cual también se generan gráficos de barra comparativos donde valores de  $P < 0,05$  entre dos grupos se consideran como promedios significativamente distintos.

### 4.4. Extracción: Pruebas a protocolos de extracción

Se hacen extracciones mediante dos protocolos, calentamiento por ácido basado en (Yang et al. 2014) [44] y por esferas de cristal basado en P. D. Villarreal et al. (2015) [68], escogiendo para posteriores estudios de identificación y cuantificación la metodología con menor tiempo de ejecución, rendimiento y resultados.

#### 4.4.1. Extracción mediante calentamiento con ácido

En primera instancia se utiliza método por calentamiento con ácido basado en (Yang et al. 2014) [44], en el cual se utiliza un ácido fuerte para ruptura de pared celular y posterior extracción de carotenoides y pigmentos, las características de este primer protocolo se pueden encontrar en el Anexo A

#### 4.4.2. Extracción mecánica con esferas de vidrio

Para la extracción se implementa protocolo modificado de P. D. Villarreal et al. (2015) [68] en el cual se utilizan esferas de cristal para ruptura de pared celular. Se masan 0,03 (g) de polvo de micelio liofilizado y previamente molido en microtubos de 2 (ml), luego se agregan 0,270 ( $\mu\text{L}$ ) de esferas de vidrio de 0,1 (mm) se agita a 4000 (rpm) por 10 minutos en *Minilys® personal homogenizer*, se enfría por 5 minutos en hielo, luego se agrega 541 ( $\mu\text{L}$ ) de una combinación de solvente acetona: petroleo eter (4:1,v:v) y se vuelve a agitar por 5 minutos, se deja enfriar por 15 minutos y luego se centrifuga a 4000 (rpm) en *Eppendorf centrifuge 5804R* por 10 minutos, luego se extrae sobrenadante y se guarda en tubos Falcon de 15 (ml) protegidos de la luz, se repite 2 veces más el agregado de solvente, agitación, centrifugación y extracción de sobrenadante, el cual se utiliza para cuantificación e identificación en etapas posteriores.

El protocolo se utiliza para extracción de *A. cruciatus* fermentado en medios con única fuente de carbono algas pardas *M. pyrifera* y *D. antarctica*, por separado y glucosa. También se hacen extracciones de las mismas algas pardas sin fermentar.

### 4.5. Cuantificación e identificación

#### 4.5.1. Espectrofotometría UV-Vis

Para la cuantificación mediante espectrofotometria se utiliza el equipo *Biochrom libra S50* con cubetas de cuarzo, basándose en el protocolo de Yun-Feng et al. (2021) [44]. Se preparan las muestras a medir mediante una dilución, de ser necesario, del extracto obtenido, generando al menos 1,5 (ml) con tal de evitar mediciones de absorbancia mayores a 0,8(A). Luego las muestras se centrifugan por 5 minutos a 12000 (g) en una centrifuga *Eppendorf centrifuge 5804R* dentro de microtubos de 2(ml) para posteriormente traspasar el sobrenadante cuidadosamente a una cubeta de cuarzo de 1 (ml). Para las diluciones y blanco de medición se utiliza una mezcla de acetona-éter de petroleo (4:1,v:v)

Finalmente, se mide la absorbancia de cada extracto entre 400 (nm) y 500 (nm) y se anotan los datos de absorbancia obtenida en cada longitud de onda determinada.

##### 4.5.1.1. Análisis de resultados

En el análisis de datos obtenidos, para creación y manejo de tablas de datos adquiridos y cálculo de concentraciones se utilizó el software *Excel*. Para realizar los análisis y comparación de datos se utiliza análisis ANOVA Brown-Forsythe y welch con el software *Graphpad Prism 8.0.1* en el cual también se generan gráficos de barra comparativos donde valores de  $P < 0,05$  entre dos grupos se consideran como promedios significativamente distintos.

### 4.5.2. Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC)

Para la posible identificación de distintos carotenoides y pigmentos, en primera instancia se utiliza un equipo HPLC con un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M10A y una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck) en fase reversa. La metodología esta basada en [44][68] y por comunicación directa de Salvador Barahona, Laboratorio de genética, Universidad de Chile. El equipo se ajusta a 1 (ml/min), presión de 2,6-3,6 (MPa) y temperatura de trabajo 25°C. La fase móvil utilizada es acetona:metanol:isopropanol en proporción (375:100:25), (v:v:v) previamente sonicada por 15 minutos en un baño ultrasonido para eliminación de burbujas de aire, a un máximo de 550 (w).

Para preparar las muestras a analizar, primero se volatilizan con nitrógeno, eliminando los solventes utilizados en la extracción, para luego resuspender en 50 ( $\mu\text{L}$ ) de acetona, dependiendo de la concentración visible. Se centrifugan a 12000 (g) por 20 segundos en tubos Eppendorf de 2 ml y se miden 20 ( $\mu\text{L}$ ) de extracto con una jeringa para inyectar en el equipo HPLC. El tiempo de medición se establece en 30 minutos y el equipo se fija a longitudes de Onda de 450 (nm) y 465 (nm).

Se utilizan estándares de  $\beta$ -caroteno y astaxantina (Sigma Aldrich), resuspendidos en acetona y centrifugados para eliminar cualquier tipo de partícula no disuelta en el solvente. Se obtienen gráficos y tiempos de retención de ambos estándares y se prosigue con las muestras a analizar.

Para una segunda instancia de medición, se utiliza equipo HPLC con un detector de arreglo de diodos Shimadzu Nexera SPD-M40 y columna C18 en fase reversa y como estándar  $\beta$ -caroteno (Sigma Aldrich). Se prepara la misma fase móvil de acetona:metanol:isopropanol en proporción (375:100:25), (v:v:v), la cual es sonicada por 15 minutos. Las muestras a analizar se filtran por un filtro de 25 micras, se coloca en viales de vidrio y se inserta en el equipo, el cual inyecta 10 ( $\mu\text{L}$ ) de muestra. Se obtiene para esta experiencia el análisis cromatográfico para la fermentación del hongo marino en glucosa únicamente.

### 4.5.3. Cromatografía líquida de ultra alta resolución- espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuadrupolar (UHPLC-QTOF)

Para la metodología de análisis de metabolómica se utiliza servicio externos de la Unidad de secuenciación y tecnologías ómicas, Pontificia Universidad Católica. Se envían muestras de biomasa extraídas según metodología de extracción con esferas de vidrio y solvente acetona:petroleo éter (4:1,v:v). Se envían extracto de *Asteromyces cruciatus* fermentado con alga parda *Durvillaea antarctica*, *Macrocistys pyrifera* y Glucosa, por separado. También se hace envío de extracto de alga *Durvillaea antarctica* y *Macrocistys pyrifera*. cada muestra en duplicado con total de 10 muestras.

Las muestras se almacenan a -80°C y antes del análisis se volatiliza y se solubiliza con 500 ( $\mu\text{L}$ ) de acetona para luego homogenizar en mezclador vortex por 10 segundos. Se transfieren muestras a vial de HPLC. Para la cromatografía se realiza la separación con una columna Kinetex C18 de 2,1 (mm) x 100 (mm), con partícula de 1,7 ( $\mu\text{m}$ ) La fase móvil se compone de un solvente A de Agua y 0,1 % de ácido fórmico y solvente B de 90 % acetonitrilo y 0,1 %

de ácido fórmico. El flujo de muestra a analizar se fija en 400 ( $\mu\text{L} / \text{min}$ ) y la fase móvil se fija en gradiente como se describe en la tabla 4.1. Durante el análisis se mantiene columna a una temperatura de 40°C mientras que las muestras se mantienen a 6°C

Tabla 4.1: Gradiente de fase móvil utilizada en análisis UHPLC-QTOF

Gradiente de fase móvil		
Minutos	%A	%B
0	88	12
1	88	12
11	1	99
13,5	1	99
14	88	12
15	88	12

Para la espectrometría de masas la adquisición de datos se realiza en modo positivo y negativo en tres segmentos. En el segmento 1 se hace una calibración del sistema, en el segmento 2 se inicia calibrante el cual permite recalibrar los resultados después de obtener datos y en el segmento 3 se realiza el análisis MS/MS de la muestra.

#### 4.5.3.1. Análisis de resultados

El análisis de datos se lleva a cabo utilizando software *Metaboscape 4.0* propiedad de *Bruker* que permite identificar metabolitos basados en su masa, su patrón de fragmentación y patrón isotópico. El patrón de fragmentación se obtuvo utilizando librerías espectrales de *MassBank of North America (MoNA)*, también se utiliza la librería *LipidBlast*, una librería teórica con lípidos y patrones de fragmentación, a cargo del Dr. Oliver Fiehn de la UC Davis.

Dentro del programa *Metaboscape* se encuentra un indicador de calidad AQ (Annotation quality) que integra todos los parámetros utilizados para identificar moléculas. El valor AQ son 4 números que pueden ser 0, 1 o 2. Un valor de 2222 muestra una alta confianza mientras que un valor 1111 muestra una menor confianza en el análisis de metabolitos. Un valor 0000 no se considera para realizar una identificación. En el caso del estudio, como la desviación de tiempo de retención no se evalúa toma un valor 0, por ende una alta confianza se muestra como un número "2202"

El indicador *Isotopic Patter Quality* se basa en un valor de calculo teórico por el programa llamado *mSigma*, un valor bajo 30 se considera bueno y entre menor sea el valor indica una mejor confianza en los resultados de intensidad obtenidos. Por último, los datos obtenidos de intensidad se analizan estadísticamente en *Graphpad Prism 8.0.1* mediante estudios "t de Welch" tomando en cuenta que los datos presentan diferentes desviación estándar y que son mediciones independientes.

# Capítulo 5

## Resultados y Discusiones

### 5.1. Crecimiento de *A. cruciatus* frente a estrés abiótico

El efecto de diferentes longitudes de onda en el crecimiento de *A. cruciatus* se evalúa mediante la medición de biomasa liofilizada después de una fermentación de 8 días con grupos de matraces en presencia de longitudes de onda específica y un grupo control en oscuridad. Según un estudio de un factor ANOVA de los resultados, no se detecta diferencias significativas de crecimiento de micelio del hongo fermentado en distintas longitudes de onda. Los datos obtenidos, como concentración de biomasa y análisis estadístico de la fermentación del hongo *A. cruciatus* con única fuente de carbono glucosa y expuesto a diferentes longitudes de onda durante su crecimiento, se pueden observar en el anexo B.

En la figura 5.1, se puede observar un gráfico resultante del análisis ANOVA, donde, en promedio, el crecimiento del hongo se ve beneficiado por la presencia de luz según los promedios obtenidos, sin embargo, las diferencias entre el promedio de cada población de datos y considerando las desviaciones estándar de cada población no son significantes dentro del análisis, es decir, las diferencias de concentración de peso seco (g/ml) entre el crecimiento de cada población no es lo suficiente para concluir que diferentes longitudes de luz afecta el crecimiento de *A. cruciatus* en medios de glucosa para esta experiencia en específico. En el estudio ANOVA, los valores P entre cada grupo supera valores de  $P > 0,1$  lo que implica que no se cumple la hipótesis nula o estar fuera de el 95 % del intervalo de confianza y los valores de concentración de peso seco obtenido de cada grupo podrían ser indistinguibles entre cada uno.

### Crecimiento de *A. cruciatus* en distintos $\lambda$

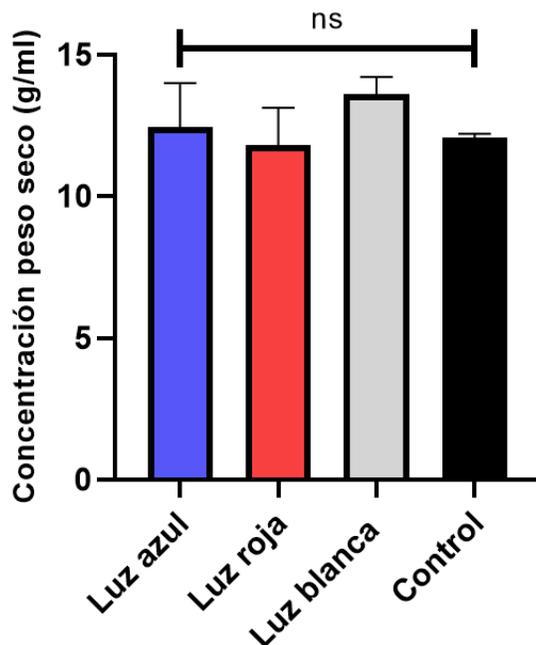


Figura 5.1: Análisis de varianza ANOVA, promedio de concentración en (g/ml) y desviación estándar de biomasa seca por milímetro de medio de cultivo fermentado con única fuente de carbono glucosa, por 8 días a 25°C en distintas longitudes de onda, no se detecta diferencias significativas entre cada grupo (ns).

Según bibliografía [1] y [67] del cual se replica el estudio para el hongo *A. cruciatus*, la luz blanca en el periodo de fermentación afecta negativamente el crecimiento de hongos marinos, lo cual no se condice con los resultados obtenidos. Sin embargo se puede recalcar que dentro de los diferentes grupos, el hongo que fermentó sin luz presenta la menor desviación estándar en comparación con otros grupos fermentados en otras longitudes de onda al menos en un orden de magnitud. La observación indica que se producen resultados estables al fermentar en ausencia de luz lo que por otro lado indica que pueden haber otros factores afectando el crecimiento del hongo en otras longitudes de onda, no se conoce en que etapa se encuentra la fermentación después de 8 días pero dado el tiempo podría ser la fase de muerte. En la figura 5.2 se puede observar dos matraces con hongo *A. cruciatus* fermentado en medio con única fuente de carbono glucosa y como única diferencia la presencia y ausencia de luz en el tiempo de fermentación. No se observan diferencias entre ambos cultivos en términos de forma de micelio y color aparente.

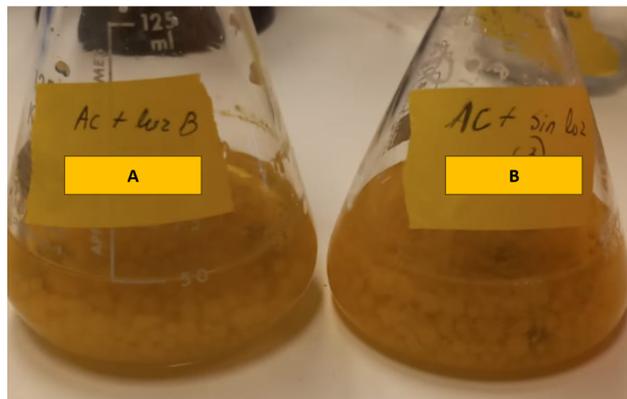


Figura 5.2: Resultado de fermentación de *A. cruciatus* con glucosa en 20(g/L) después de 8 días. En la izquierda (A) el hongo fermentado con luz blanca mientras que a la derecha (B) el hongo fermentado en ausencia de luz.

En la tabla 5.1 se puede observar que las desviaciones estándar de cada grupo a diferencia del grupo control, presentan una alta variabilidad dentro de un mismo grupo y entre grupos distintos. Dentro de los posibles factores que pueden afectar la variabilidad de los resultados para grupos con presencia de luz, puede deberse a que la luz del equipo no es homogénea para todo matraz ya que la fuente de luz se encuentra en el plano donde se posicionan los matraces a un lado dentro del interior del equipo en comparación con una fuente de luz sobre los matraces en el modelo experimental de [67]. Algunos matraces y dado por el diseño del equipo, quedan posicionados mas cerca de la fuente de luz mientras que otros se ven con una menor intensidad dado por el bloqueo de otros matraces más cercanos a la fuente de luz. Como no se conoce la diferencia de intensidad de luz dado por la posición en el equipo de fermentación, queda para un posible estudio determinar la intensidad de la luz y si afecta los resultados para crecimiento del hongo *A. cruciatus* con distintas longitudes de onda.

Tabla 5.1: Desviación estándar de mediciones de concentración (mg/ml) de biomasa seca por milímetro de medio de cultivo a distintas longitudes de onda

Grupo	Luz azul	Luz roja	Luz blanca	Control
Desv. Est	1,547	1,317	0,601	0,150

Otro factor influyente en los resultados obtenidos es la separación manual de medio de cultivo restante y biomasa. Es posible la pérdida de una parte de la biomasa por ser de forma manual y al mismo tiempo por residuos que pueden haber quedado dentro de los matraces de fermentación, alterando así los resultados o aumentando variabilidad entre grupos.

Para siguiente estudios, se sugiere no comprobar con luz en las longitudes de onda en verde y amarillo dado que para resultados de [67] y para 5 diferentes hongos se comprueba una diferencia significativa negativa en el crecimiento de biomasa, contenido de pigmentos intracelular y pigmentos extracelulares. Además, se sugiere hacer mediciones de contenido de carotenoides mediante espectrofotometría, ya que para futuras aplicaciones se podría maxi-

mizar la relación entre la producción de carotenoides y biomasa producida en un rango de longitud de onda definido con aplicaciones en la optimización de crecimiento de biomasa y/o optimización de contenido de carotenoides por peso seco de micelio.

Según [67], en el reino fungi la luz, en ausencia o presencia, es parte fundamental en la regulación del crecimiento de los hongos, producción de metabolitos secundarios y reproducción, dado la reacción que desencadena la activación de los fitocromos en los hongos, los cuales son aspectos importantes para la supervivencia. Aún así queda por determinar los mecanismo con lo cual el hongo *A. cruciatus* asimilan la presencia o ausencia de luz durante su crecimiento mediante fotoreceptores sensibles a luz y como afecta en consecuencia la producción de carotenoides.

## 5.2. Extracciones de carotenoides

### 5.2.1. Extracción química por calentamiento con ácido

El efecto de producción de carotenoides en fermentación con diferentes fuentes de carbono, como algas pardas y glucosa, del hongo *A. cruciatus* se evalúa según el contenido de carotenoides medido con espectrofotometría UV-vis de la biomasa obtenida después de una fermentación de 8 días. Los datos y resultados de la experiencia de extracción con una metodología basada en calentamiento por ácido se encuentran en el anexo A.

Según los resultados, como se tiene solo un grupo limitado de datos, es posible que la fermentación del hongo con glucosa genera pigmentación dada por carotenoides u otro pigmento fúngico proveniente de *A. cruciatus*, según los resultados obtenidos de la medición de absorbancia a una longitud de onda de 450 (nm) y utilizando la ecuación de Beer-Lambert para calcular concentración, teniendo en cuenta el tipo de solvente y dilución de las muestras, se obtiene la concentración de carotenoides por gramo de peso seco de biomasa liofilizada como se puede observar en la figura 5.3.

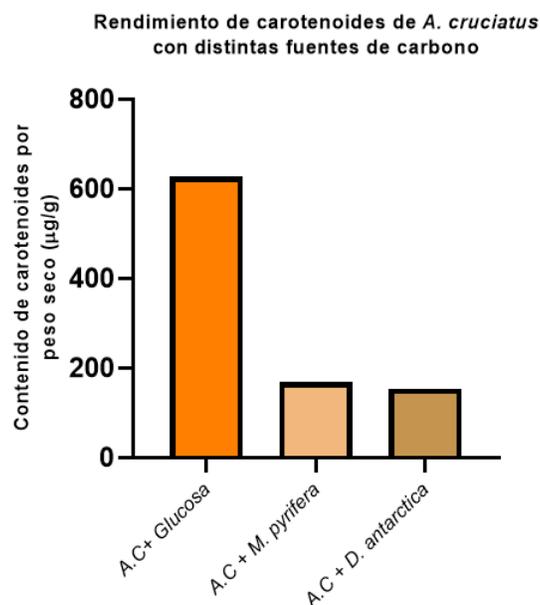


Figura 5.3: Gráfico de concentración de carotenoides por gramo de biomasa extraída, fermentación por 8 días a 25°C

Dado que los datos no son suficientes para un análisis estadístico, es importante recalcar que se necesita de más pruebas y replicar el experimento para generar un análisis robusto y conclusiones respecto a la variable de tratamiento, que en este caso es como la fuente de carbono en la fermentación afecta el rendimiento de carotenoides, sin embargo la tendencia observada en el gráfico 5.3 sugiere un posible efecto positivo en el uso de glucosa como fuente de carbono en el rendimiento, mientras que el uso de algas pardas podría generar un rendimiento similar y de menor cantidad.

Con respecto al uso de algas pardas, los resultados observados sugieren un rendimiento similar, lo cual podría estar dado por el hecho de que las fuentes de carbono utilizadas son de gran similitud y tienen una composición de azúcares complejas parecida. Además, es importante notar que, al usar algas pardas y en específico *M. pyriferia* y *D. antarctica* además de azúcares complejas, contienen una cantidad propia de carotenoides, metabolitos secundarios, enzimas y vitaminas que pueden afectar la carotenogénesis a diferencia de glucosa, siendo un azúcar simple. Replicar la extracción de carotenoides con el método de calentamiento por ácido es esencial para confirmar la tendencia observada y por otro lado poder hacer un estudio a fondo de como se comporta el rendimiento de carotenoides dependiendo del alga parda utilizada en la fermentación así mismo como la técnica de extracción.

En el gráfico 5.4 se puede observar la absorbancia obtenida para distintas longitudes de onda medidas. Por un lado, se puede observar una tendencia similar en el uso de algas pardas como fuente de carbono mientras que se ve una tendencia distinta en el uso de glucosa, donde la absorbancia máxima se logra alrededor de los 440 (nm) mientras que con el uso de algas pardas es poco clara la máxima absorbancia. En el caso de uso de glucosa y teniendo en cuenta las propiedades de absorbancia de carotenoides, las mediciones podrían indicar una similitud con bibliografía que menciona una absorbancia máxima para carotenoides entre 430-450 (nm) utilizando solventes como acetona y petróleo éter como es el caso de estudio, por otro lado,

otros pigmentos fúngicos de hongos, como policétidos pueden tener absorbancias máximas entre 200-500 (nm) dependiendo del compuesto específico, en el caso de uso de algas pardas, la tendencia que se observa puede deberse a presencia de clorofilas, otros pigmentos y una posible menor cantidad de carotenoides, los cuales pueden provenir tanto del hongo como de restos de algas no consumidos por el hongo dentro del periodo de fermentación.

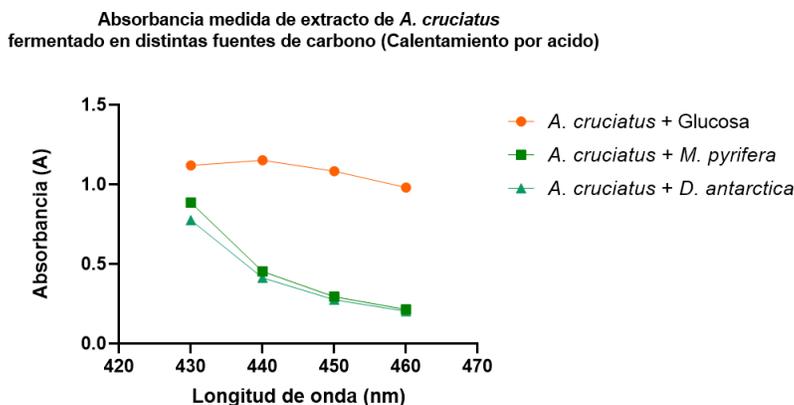


Figura 5.4: Absorbancias medidas de extracto de *A. cruciatus* fermentado con distintas fuentes de carbono, método de extracción calentamiento con ácido.

Por último y en consecuencia de la fermentación de *A. cruciatus* con glucosa y algas pardas, se puede observar que los pigmentos producidos en la fermentación con glucosa son propios del hongo, dado que la glucosa y el medio no poseen pigmentos inicialmente, mientras que pigmentos de tono verde a café obtenidos en los extractos pueden provenir tanto del hongo utilizado como de las algas utilizadas y no consumidas por el hongo durante el transcurso de la fermentación, generando ruido experimental en las comparaciones, sin embargo es importante notar que se necesitan más estudios con réplicas adecuadas para establecer un vínculo concluyente entre la fermentación con las fuentes de carbono utilizadas, las tendencias en las absorbancias medidas y los rendimientos de carotenoides obtenidos para así también poder hacer comparaciones concluyentes entre distintos métodos de extracción.

### 5.2.2. Extracción mecánica con esferas de vidrio

Los datos y resultados obtenidos de contenido de carotenoides para biomasa extraída de algas pardas *M. pyrifera* y *D. antarctica* y el hongo marino *A. cruciatus*, fermentada en medios con única fuente de carbono glucosa y algas pardas se encuentran en el Anexo C.

La extracción mecánica, a diferencia del uso de un ácido fuerte, se basa en el principio de disrupción de pared celular de plantas y hongos, donde el último tiene como dificultad de extracción una pared de quitina propia del reino fungi. Una de sus ventajas es no utilizar ácidos para la ruptura de pared celular, lo que puede generar una menor oxidación en metabolitos secundarios y cambios químicos en los posibles carotenoides de la biomasa extraída, por último, una gran diferencia entre las metodologías de extracción es el tiempo total utilizado el cual es menor a una extracción con ácido, lo que en consecuencia protege a los pigmentos extraídos de degradación por contacto con luz, oxígeno y calor. Esta metodología podría generar un mayor rendimiento de extracción dado los resultados obtenidos.

De la metodología con esferas de vidrio, se extrae en 4 ocasiones biomasa proveniente de la fermentación de *A. cruciatus* con glucosa, *M. pyrifer* y *D. antarctica*, también se extrae carotenoides de algas pardas *M. pyrifer* y *D. antarctica* sin fermentar. En la figura 5.5 a la izquierda se puede observar el gráfico resultante del estudio ANOVA (Análisis de varianza ANOVA.  $P < 0,05$ ) del contenido de carotenoides calculado en base a la medición de absorbancia a 450 (nm) donde se puede observar que el hongo *Asteromyces cruciatus* fermentado con única fuente de carbono glucosa tiene un contenido de carotenoides significativamente mayor al mismo hongo fermentado con únicas fuentes de carbono *M.pyrifer* y *D. antarctica* y también contenido de carotenoides solo de la extracción de las algas *M.pyrifer* y *D. antarctica*. Por otro lado, en la figura del lado derecho se puede observar el contenido de carotenoides extraído del hongo fermentado con algas pardas y solo extracción de alga pardas, el resultado de múltiples comparaciones indica que no hay diferencias significativas entre los distintos grupos por lo que se puede asegurar que la fermentación con glucosa tiene un contenido de carotenoides significativa en comparación con la fermentación con única fuente de carbono algas pardas y algas pardas por si solas, mientras que el hongo fermentado en distintas algas pardas no presenta diferencias significativas en el contenido de carotenoides en comparación a la extracción de solo algas.

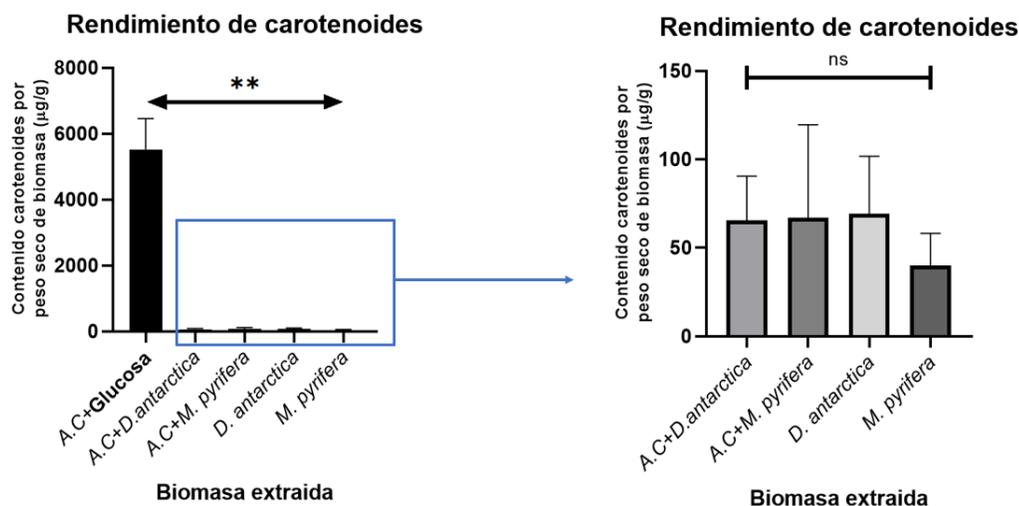


Figura 5.5: Resultados de estudio ANOVA de datos obtenidos de cuantificación de carotenoides de extracto de algas pardas y extracto de la fermentación de hongo marino *A. cruciatus* con fuentes de carbono algas pardas y glucosa. La fermentación dura 8 días a 25°C. Se detectan diferencias significativas (\*\*) en contenido de carotenoides para la fermentación con única fuente de carbono glucosa, mientras que para las fermentaciones con algas y solo algas no presentan diferencias significativas entre si (ns).

Observando promedios, desviaciones estándar y tomando como supuesto de que el contenido calculado son en su totalidad carotenoides, como se ve en la tabla 5.2, el rendimiento de carotenoides de hongo marino que fermentó glucosa presenta un promedio de rendimiento de 5520 (µg/g) de peso seco lo que se asemeja a rendimientos de hongos tales como *Xanthophy-*

*llomyces dendrorhous*, obteniendo un poco menos de la mitad en comparación con el último hongo de uso industrial, mientras que en comparación con *Rhodospodium toruloides* podría producir una cantidad de hasta 10 veces más de carotenoides, posicionándose sobre hongos como *Neurospora crassa* (141,1 ( $\mu\text{g/g}$ )) y *Sporidiobolus pararoseus* (181 ( $\mu\text{g/g}$ )). Estos resultados implican que, el hongo *Asteromyces cruciatus* se presenta como una opción viable en la producción de forma industrial o para posteriores estudios que optimicen el rendimiento.

Observando los resultados del hongo marino que fermentó algas pardas y el contenido de carotenoides de solo algas pardas, el rendimiento de *D. antarctica* se asemeja a lo estudiado en bibliografía que indica un rendimiento de 32,9 ( $\mu\text{g/g}$ ) mientras que lo obtenido de la extracción es un promedio de  $69,13 \pm 32,68$  ( $\mu\text{g/g}$ ), aun así se obtiene una alta variabilidad en los resultados. En contraposición, el rendimiento promedio de solo *M. pyrifer* es alrededor de 7 veces menor de lo que indica bibliografía ( $\sim 300$  ( $\mu\text{g/g}$ )), lo que podría estar dado por una metodología de extracción no afín con el tipo de alga parda o bien las condiciones climáticas de su cosecha y condiciones de crecimiento no son las mismas que las algas utilizadas para el presente estudio. Los datos bibliográficos corresponden a algas *M. pyrifer* cosechadas en Baja California, México, en el hemisferio norte [56] en comparación a las utilizadas en el estudio, las cuales fueron cosechadas en la zona austral de Chile. Para el hongo marino que fermentó algas pardas, no hay diferencias significativas entre los resultados de rendimiento de carotenoides con los obtenidos de la extracción de algas pardas sin fermentar (Análisis de varianza ANOVA.  $P < 0,05$ ). Sumado a lo anterior, se observa que ambos rendimientos se encuentran bajo los de *Neurospora crassa* de 141( $\mu\text{g/g}$ ) [50].

Tabla 5.2: Promedio y desviación estándar calculados de la mediciones de contenido de carotenoides medido a 450 (nm)

Parámetros medición de contenido carotenoides medido a 450 nm ( $\mu\text{g/g}$ )					
	Ac+Glucosa	Ac+D. antarctica	Ac+M. pyrifer	D. antarctica	M. pyrifer
Promedio	5520,6	65,54	66,98	69,13	40,08
Desv. Est	934,33	25,01	52,54	32,68	18,08

En la figura 5.6 se pueden observar las absorbancias medidas de las 4 instancias de extracción de carotenoides, donde es importante notar la tendencia o forma del espectro obtenida de cada extracto y en consecuencia la longitud de onda aproximada de la absorbancia máxima, los datos específicos de absorbancia no son comparables entre distintos gráficos para este caso particular, dado que cada extracción se hace a partir de una cantidad de biomasa en específico y se mide a partir de una dilución del extracto. De la figura que posee 4 gráficos, se observa la tendencia de la medición del hongo *A. cruciatus* que fermentó glucosa, el cual muestra una absorbancia máxima entre 430 y 440 (nm) de longitud de onda, lo que se asemeja a la absorbancia máxima de carotenoides de interés, por otro lado, la tendencia de los extractos del hongo marino que fermentó algas pardas y solo algas pardas sin fermentar, no presenta una tendencia clara en la absorbancia máxima, la cual podría estar en longitudes de onda menores a 400 (nm), necesitando de más mediciones en longitudes de onda menor a 400 (nm).

Se puede observar en las 4 mediciones que la intensidad de absorbancia aumenta a medida que disminuye la longitud de onda para todos las biomasa extraídas excepto la biomasa de hongo marino que fermentó glucosa, lo que se puede asemejar a espectros de absorbancia de

posibles pigmentos provenientes de clorofilas o interferencias de otros metabolitos secundarios en el espectro de absorción. Observando el color aparente de los extractos antes de su medición, se puede ver claramente una pigmentación verdosa en comparación con el extracto de *A. cruciatus* que fermentó glucosa, lo que se condice con los resultados de absorbancia obtenidos. En la figura 5.7 se puede observar la apariencia de los extractos antes de su análisis.

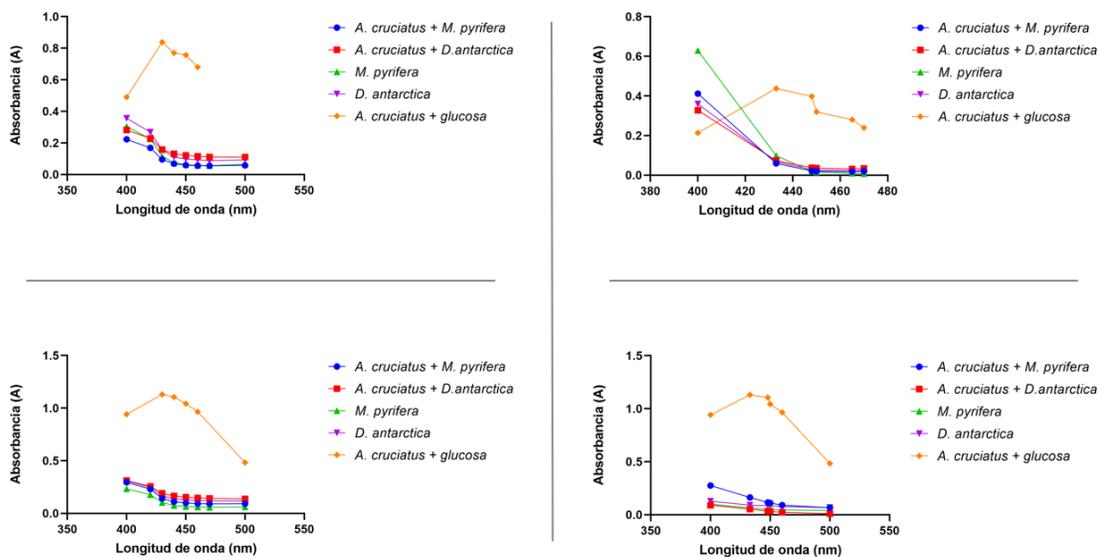


Figura 5.6: Absorbancias medidas a distintas longitudes de onda de biomasa extraída en experiencia de extracción mecánica

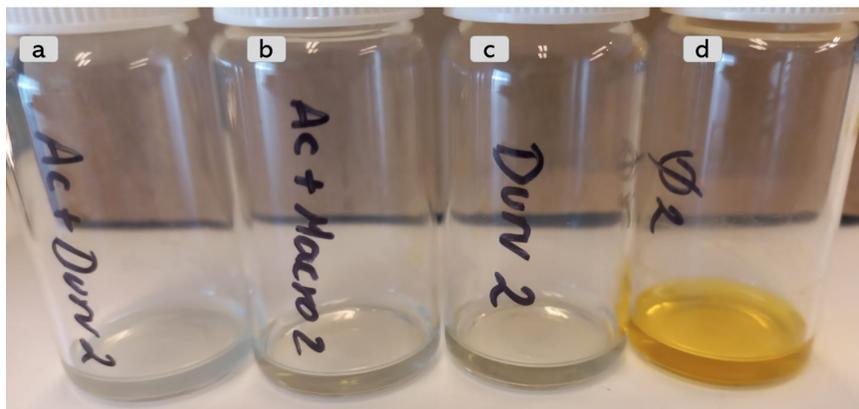


Figura 5.7: Extractos de biomasa liofilizada, donde (a) *A. c* fermentado con *D. antarctica*, (b) *A. c* fermentado con *M. pyrifera*, (c) Extracto de alga parda *D. antarctica* sin fermentar y (d) *A. c* fermentado con glucosa.

Respecto al método de cuantificación, la espectrofotometría es limitada ya que se necesita conocer el carotenoide el cual se está identificando y un estándar de alta calidad con el cual comparar los resultados obtenidos, también es muy probable que en un extracto de una biomasa poco estudiada tenga diferentes carotenoides u otro tipo de pigmentos solubles en los solventes de extracción generando una posible sobre estimación de contenido de carotenoides,

la bibliografía indica que existen pigmentos de baja polaridad, que también poseen absorbancia máxima entre las longitudes de onda entre 400 y 500 (nm), para futuras experiencias, es necesario poder contar con un estándar de  $\beta$ -caroteno, generar una curva de calibración y luego comparar con los resultados obtenidos de las mediciones en espectrofotómetro. El problema de muestras con una posible cantidad de clorofilas es la superposición de bandas de absorbancia en la misma región que algunos carotenoides generando ruido experimental en los cálculos de contenido de carotenoides con la ley de Beer-Lambert.

La diferencia significativa entre rendimientos de carotenoides puede estar dado por la naturaleza de la fuente de carbono utilizada en la fermentación, se sabe que las algas pardas, además de carbohidratos complejos, presenta también diferentes compuestos y metabolitos secundarios de naturaleza antioxidante como carotenoides y xantófilas propias de las algas en ambas algas utilizadas o contenido de vitamina E en *D. antarctica* generando un ambiente poco oxidativamente estresante para el hongo *A. cruciatus* y por lo tanto no generando la necesidad biológica de producir carotenoides en una alta cantidad como respuesta ante estrés oxidativo.

La glucosa, es un azúcar simple que es parte directa de la vía metabólica de distintos carotenoides, además de ser un azúcar reductor dado por el grupo aldehído (-CHO) presente en la molécula, este grupo aldehído tiene la capacidad de reducir otras moléculas, generando así un ambiente oxidante para el hongo marino. En el caso de algas, el hongo necesita degradar mediante enzimas los azúcares complejos de las algas pardas que no están libres en el medio a diferencia de la fermentación con glucosa reduciendo así su posible concentración libre en el medio, lo anterior podría ser una de las razones por la cual se obtiene un alto rendimiento de carotenoides con glucosa como única fuente de carbono, en comparación con algas pardas, sin embargo, una sola fuente de carbono simple como la glucosa puede causar una baja representatividad en la diversidad de metabolitos secundarios posibles a producir. Para siguientes estudios y para utilizar algas pardas como fuente de carbono, se podría estudiar el rendimiento de carotenoides fermentados en algas pardas y distintos métodos de estrés abiótico como el uso de  $KMgO_4$  o  $NaCl$  en distintas concentraciones el cual genera un mejor rendimiento en el hongo *C. militaris*. [44]

## 5.3. Identificación y comparación de carotenoides por HPLC y UHPLC - QTOF

### 5.3.1. HPLC, primera fase

Se logró analizar extracto del hongo *A. cruciatus* fermentado con única fuente de carbono glucosa y algas pardas *M. pyrifera* y *D. antarctica*, también se analiza extractos de algas pardas sin fermentar. Para la identificación de carotenoides, primero se prepara una muestra con estándares de  $\beta$ -caroteno y astaxantina con lo que se obtiene peaks en tiempos de retención alrededor de 2,35 minutos para astaxantina y 18,41 minutos para  $\beta$ -caroteno con una mayor intensidad (mAU) en la longitud de onda 465(nm) comparado a las mediciones en longitudes de onda menor.

Luego, se obtiene el análisis de extracto de hongo *A. cruciatus* fermentado con glucosa como única fuente de carbono y se identifican 3 peaks, el primer peak en 1,373 minutos, el

segundo peak a 1,63 minutos y el tercer peak a 1,8 minutos, los dos últimos con intensidades similares a 2000 (mAU), la mayor intensidad (mAU) general se detecta a 465 (nm).

Para el extracto de hongo marino que fermentó el alga parda *D. antarctica* se identifica un solo peak en 0,742 minutos y una intensidad de 35 (mAU) a 465 (nm) de longitud de onda, mientras que para extracto de alga *D. antarctica* se identifican 2 peaks, uno en 3,091 minutos y un segundo peak en 3,836 minutos, ambos de alrededor de 50 (mAU). Por otro lado, no se identifican peaks para hongo marino que fermentó *M. pyrifer* y extracto de *M. pyrifer* sin fermentar. En la tabla 5.3 se puede observar los datos mencionados.

Tabla 5.3: Resumen de datos obtenidos de intensidad (mAU) y tiempos de retención (min) de muestras analizadas en HPLC.

Estándares		
465 (nm)	Tiempo ret (min)	Intensidad (mAU)
astaxantina	2,358	1449
$\beta$ -caroteno	18,416	472

<i>A. cruciatus + glucosa</i>		
465 (nm)	Tiempo ret (min)	Intensidad (mAU)
Peak 1	1,373	309
Peak 2	1,628	1880
Peak 3	1,802	2002

<i>A. cruciatus + D. antarctica</i>		
450 (nm)	Tiempo ret (min)	Intensidad (mAU)
Peak 1	0,72	7,8

<i>D. antarctica</i>		
450 (nm)	Tiempo ret (min)	Intensidad (mAU)
Peak 1	3,091	37,6
Peak 2	3,836	11

De los resultados obtenidos y observando los tiempos de retención, se puede generar dos hipótesis, dado los tiempos de retención obtenidos se podría estar identificando pigmentos que no son de tipo carotenoide o una posible oxidación de los mismos, propia o impropia de la vía metabólica del hongo marino, causando una mayor polaridad y por ende menores tiempos de retención. En el caso de no ser carotenoides o xantófilas, se podría estar observando el peak de otro tipo de pigmentos fúngicos (policétidos) como posibles quinonas (antra-, naphtho-, hydroxyanthra- ect) por el color naranja observado en el extracto de hongo fermentado en glucosa. La presencia de varios compuestos diluidos en la muestra y la naturaleza compleja de

la matriz de donde se extraen los carotenoides (biomasa liofilizada) puede generar peaks en menores tiempos de retención dado por interacciones moleculares dentro del mismo extracto y con la fase móvil utilizada, haciendo inexacto el análisis y causando tiempos de retención menores a los esperados.

De los gráficos y resultados, se podría inferir que se está detectando una misma molécula o moléculas similares, en distintas intensidades y que podría estar produciendo solo el hongo al fermentar distintas fuentes de carbono, como la intensidad de un peak detectado en extracto de *A. cruciatus* fermentado en *D. antarctica* es bajo en comparación a otros extractos, no se descarta que se podría estar en presencia de un error o ruido experimental. También se destaca la intensidad obtenida para los 2 últimos peaks de *A. cruciatus* fermentado con glucosa, que asimila la intensidad del estándar de astaxantina. Como no se tiene una curva de calibración para cuantificación, no se pueden generar conclusiones respecto a las concentraciones, pero si se puede observar que las vías metabólicas, dado las fuentes de carbono utilizadas, podrían direccionar a la producción de un conjunto de metabolitos secundarios específicos y acotados. Para futuros estudios es importante generar una curva de calibración con estándares de carotenoides para poder tener un estimado de concentración y hacer comparaciones tanto de concentración como de especificidad. También, dado los resultados de la espectrofotometría UV-Vis, sería ideal comprobar la absorbancia máxima en ambos métodos o en que longitud de onda se logra obtener la mayor intensidad, especialmente la medición en longitudes de onda entre 430-440 (nm).

Por último, es importante reconocer que podrían haber surgido ciertos errores o limitaciones debido a la utilización de un equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) antiguo y sus componentes asociados. El estado del equipo presente en las dependencias de la Universidad de Chile, campus Juan Gomez Millas puede introducir variaciones que podrían influir en la exactitud y precisión de los resultados obtenidos. A pesar de mantener y calibrar el equipo, es posible que factores como la degradación de la columna, la ineficacia de la bomba o la sensibilidad del detector hayan contribuido a las variaciones en los tiempos de retención e intensidades medidas, como se puede observar en algunos gráficos, la intensidad llega a valores negativos lo que es un error del propio instrumento.

### 5.3.2. HPLC, segunda fase

Para la segunda fase, se analiza estándar de  $\beta$ -caroteno obteniendo un tiempo de retención de 10,85 minutos, así mismo con identificación de posibles impurezas propias de la muestra. La mayor intensidad obtenida, de 1069 (mAU), se encuentra en la longitud de onda de 454 (nm) lo que es lo esperado para el carotenoide específico y los solventes utilizados según bibliografía.

Luego, se obtiene análisis del hongo marino que fermentó glucosa logrando la mayor intensidad a 433 (nm) de longitud de onda, lo que se puede observar en la figura 5.8, coincidiendo con las mediciones en espectrofotometría UV-Vis. Se detectan 2 peaks, el primero a 2,43 minutos con una intensidad de 1646 (mAU) y el segundo peak a 2,73 minutos con una intensidad de 368,5 (mAU), la totalidad de datos se puede encontrar en el Anexo E.3 en la tabla E.1.

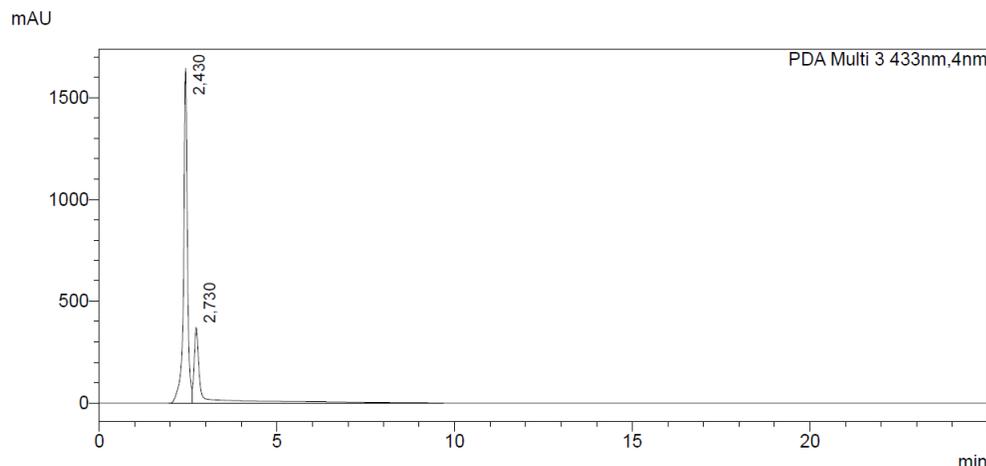


Figura 5.8: Análisis HPLC fase reversa de extracto de *A. cruciatus* fermentado en glucosa medido a 433 (nm)

Nuevamente, se comprueba la especificidad de metabolitos secundarios en el extracto analizado y que coincide con las mediciones de la primera fase de HPLC. Como se puede observar en el gráfico de estándar de  $\beta$ -caroteno, se detectan varios peaks relacionados a impurezas propias del carotenoide o que también podrían ser oxidaciones e isomerizaciones en contraposición con la ausencia de otros peaks menores en el gráfico de extracto de hongo marino que fermentó glucosa.

En el análisis se detectan 2 peaks con una proporción de intensidad similar a la primera fase de HPLC asimismo como tiempos de retención siendo levemente mayores en la segunda fase de HPLC, lo cual puede ser por las características propias del equipo y las medidas de la columna C18 lo cual afecta el tiempo en que interaccionan las moléculas de la fase móvil y extracto. En contra parte, el estándar de  $\beta$ -caroteno aparece en un menor tiempo de retención que en la primera fase de HPLC por al menos 8 minutos. Dado que se ocupa la misma fase móvil, métodos de extracción, biomasa extraída y solventes, las diferencias podrían estar dadas por las propias diferencias en los equipos, siendo el modelo del equipo utilizado en la segunda etapa más moderno. Finalmente y para futuros trabajos se necesita para la segunda etapa, análisis de extractos de hongo marino que fermentó algas pardas para poder hacer comparaciones entre etapas de HPLC y entre los mismos resultados obtenidos.

Dado que las muestras de extractos analizadas mediante HPLC en la primera y segunda etapa provienen de matrices complejas y podrían contener varios tipos de metabolitos secundarios, además de pigmentos fúngicos y carotenoides, una etapa de análisis MS es fundamental para direccionar la extracción y cuantificación, dependiendo del carotenoide específico que se requiera extraer y posteriormente identificar.

### 5.3.3. UHPLC-QTOF

Para un análisis UHPLC-QTOF se generan extractos mediante la metodología de extracción mecánica con esferas de vidrio, en duplicado de *A. cruciatus* que fermentó glucosa como única fuente de carbono, única fuente de carbono *M. pyrifer*a y única fuente de carbono *D. antarctica* además de extractos en duplicado de algas pardas *M. pyrifer*a y *D. antarctica* sin

fermentar. Los datos de biomasa utilizada, extracciones, volumen extraído, normalización de datos, totalidad de análisis estadístico entre grupos de datos y otros cálculos se pueden encontrar en el Anexo F.

Del estudio de metabolómica de extractos de biomasa, generado por servicios externos de la Pontificia Universidad Católica de Chile, laboratorio de metabolómica, se detectan 126 señales, de las cuales 2 se identifican como pigmentos carotenoides, apocarotenal (8'-apo-beta,psi-caroten-8'-al) y fucoxantina, mientras que otro pigmento de color naranja y no carotenoide se reconoce como 6-methyl-1,3,8-trihydroxyanthraquinona o emodina en una alta intensidad e incluso mayor que los carotenoides, el cual podría ser responsable de la coloración anaranjada en el extracto de *A. cruciatus* con glucosa como única fuente de carbono, como se ve preliminarmente en los resultados en la tabla 5.4 y en la imagen 5.7.

Otros metabolitos secundarios se detectan en gran intensidad, pero no corresponden a policétidos o carotenoides, sin embargo, es importante notar la presencia de aminoácidos, lípidos y otras moléculas que no se consideran para el estudio pero si para posteriores discusiones. En la figura 5.9 se puede observar la estructura química de los 3 pigmentos predominantes encontrados en las muestras analizadas, donde 2 contienen una cadena formada por unidades isoprenoides (fucoxantina y apocarotenal) mientras que otro pigmento pertenece a la familia de los policétidos y específicamente de las antraquinonas el cual, según las mediciones, podría ser generado por el hongo marino y no algas pardas, lo cual se discute más adelante.

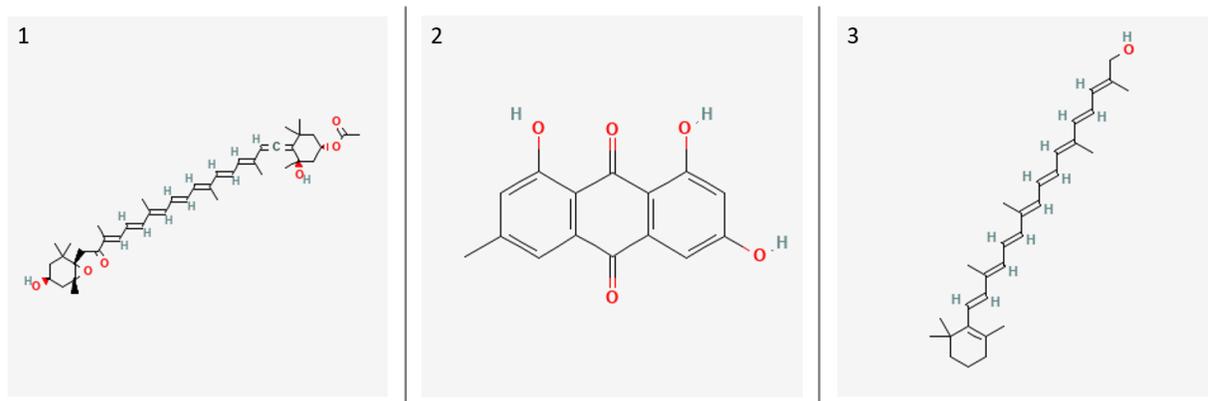


Figura 5.9: Estructura química de (1) fucoxantina, (2) emodina y (3) 8'-apo-beta,psi-caroten-8'-al, imágenes obtenidas de [69]

En la tabla 5.4 se puede observar los resultados de intensidades normalizado por la biomasa extraída y en la tabla 5.5 se puede observar la media y desviación estándar. En primer lugar se tiene la presencia de apocarotenal el cual se destaca por tener intensidades nulas en solo algas, mientras que el hongo marino fermentado con algas y glucosa presenta distintas intensidades, siendo el mayor promedio el hongo fermentado en glucosa en una cantidad promedio de  $72,85 \pm 7,74(I/\mu g)$  seguido del hongo marino fermentado con alga *D. antarctica* con un promedio de  $35,34 \pm 10,3(I/\mu g)$ . También observando las mediciones de intensidad de cada muestra, en la tabla 5.4 se puede ver que ambas intensidades medidas de las muestras de hongo marino que fermentó con alga *D. antarctica* superan ambas mediciones de hongo marino que fermentó el alga *M. pyriferá*.

Según los valores P obtenidos de un estudio t de Welch (Anexo F, tabla F.4), para datos independientes, se obtiene que hay diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre el hongo marino que fermentó glucosa y el hongo marino que fermentó el alga *M. pyrifera* y ambas algas pardas. Por otro lado, no tomando en cuenta comparaciones entre el hongo marino que fermentó con glucosa, no se observan diferencias significativas entre rendimientos de cada grupo, por lo que estadísticamente el rendimiento de apocarotenal no es significativamente distinto entre fermentar el hongo con algas pardas o el contenido encontrado en solo algas pardas. Es importante notar que en ambas fermentaciones con algas, la mayor intensidad se logra en la muestra (1) y es importante recalcar que cada corrida de muestras (1) o (2) se preparó en una misma instancia de extracción. Las diferencias en intensidades puede estar dado por el tiempo de espera, condiciones de almacenamiento o error humano en seguir el protocolo de extracción antes del análisis, por lo que para futuros análisis, es necesario que el tiempo entre la extracción de biomasa y análisis MS sea en el menor tiempo posible, además de asegurar un almacenamiento hermético y purgado previamente con nitrógeno gaseoso para evitar contacto con oxígeno.

Tabla 5.4: Intensidades normalizadas por biomasa extraída ( $I/\mu\text{g}$ ) de cada molécula identificada por análisis UHPLC-QTOF en duplicado, mediciones de muestras independientes.

RT [min]	PM (g/mol)	Nombre	Formula molecular	mSigma	1) <i>A. c + D. antarctica</i>	2) <i>A. c + D. antarctica</i>	1) <i>A. c + M. pyrifera</i>	2) <i>A. c + M. pyrifera</i>	1) <i>A. c + Glucosa</i>
5,05	270,24	emodina	C15H10O5	1,7	0,00	0,00	0,00	0,00	1914,34
7,71	270,24	emodina	C15H10O5	13,8	9,49	12,39	21,18	18,57	736,47
10,32	416,6	8'-apo-beta,psi-caroten-8'-al	C30H40O	$\infty$	42,61	28,05	19,34	10,87	67,38
11,11	658,91	fucoxantina	C42H58O6	25,2	374,72	0,00	155,55	44,93	6,76

RT [min]	PM (g/mol)	Nombre	Formula molecular	mSigma	2) <i>A. c + Glucosa</i>	1) <i>D. antarctica</i>	2) <i>D. antarctica</i>	1) <i>M. pyrifera</i>	2) <i>M. pyrifera</i>
5,05	270,24	emodina	C15H10O5	1,7	2041,54	0,00	0,00	0,00	0,00
7,71	270,24	emodina	C15H10O5	13,8	820,46	1,14	2,31	2,61	2,21
10,32	416,6	8'-apo-beta,psi-caroten-8'-al	C30H40O	$\infty$	78,32	0,00	0,00	2,75	0,00
11,11	658,91	fucoxantina	C42H58O6	25,2	0,00	888,23	358,66	73,66	2,27



Según bibliografía, ambas algas pardas presentan una cantidad base de  $\beta$ -caroteno el cual no es detectado siendo un resultado inesperado, pero se estima que, y suponiendo que en efecto se tiene presencia de  $\beta$ -caroteno y subsecuentemente apocarotenal por oxidación en algas pardas, las cantidades detectadas en el hongo marino que fermentó algas pardas podría ser mayor que la cantidad encontrada en las algas pardas sin fermentar. Otra posible explicación a las intensidades detectadas es la metodología de extracción que podría ser afín para extracción desde micelio de hongo pero no así con algas pardas, ya que su composición de pared celular es distinta y por ende podría necesitar de otros métodos extractivos para generar un mayor rendimiento. Según las metodologías de extracción en [2] y [32] agregar una etapa de saponificación podría generar mejores rendimientos solo para algas, dado su contenido de clorofilas que interviene con mediciones de carotenoides, lo que podría generar una comparación de mayor precisión. Por otra parte, también verificar la cantidad de carotenoides en algas pardas podría generar conclusiones respecto a si el hongo marino puede generar mayores rendimientos de carotenoides consumiendo algas pardas que los ya presentes en las algas sin fermentar.

En el caso de fucoxantina se debe tener en cuenta el valor de mSigma (25,2) el cual es cercano a 30 o el límite máximo de confianza en la medición, generando valores de desviación estándar altos como se ve en la tabla 5.5. El hongo marino podría producir una pequeña cantidad de fucoxantina con glucosa como fuente de carbono, sin embargo, es aparentemente menor a la cantidad que podría ser extraída de *D. antarctica* el cual presenta el mayor promedio de  $623,45 \pm 374,47$  (I/ $\mu$ g) seguido de hongo marino que fermentó *D. antarctica*  $187,37 \pm 264,97$  (I/ $\mu$ g). Como se tiene una alta variabilidad en los resultados obtenidos, dando así valores P mayores al límite de significancia ( $P > 0,05$ ) en análisis estadísticos, no está claro si hay una mejora de rendimiento de fucoxantina dependiendo de en que fuente de carbono fermento el hongo marino o si las algas pardas por si solas presentan mejor rendimiento. Es importante recalcar que *D. antarctica* presenta una alta cantidad de fucoxantina y curiosamente una de las intensidad medidas de 1) *A. c + D. antarctica* es similar a la intensidad medida de 2) *D. antarctica*. Una posible fuente de error en la medición de la xantofila es que el hongo marino durante los 8 días de fermentación, no consume en su totalidad el alga parda, quedando así biomasa con posibles restos de metabolitos secundarios no degradados propios del alga parda y no producidos por el hongo marino.

Tabla 5.5: Media y desviación estándar de mediciones de intensidad normalizado por biomasa extraída (I/ $\mu$ g) de pigmentos detectados mediante UHPLC-QTOF

Pigmento	<i>A. c + Glucosa</i>	<i>A. c + D. antarctica</i>	<i>A. c + M. pyrifera</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>M. pyrifera</i>
Apocarotenal	$72,85 \pm 7,74$	$35,34 \pm 10,3$	$15,11 \pm 5,99$	$0 \pm 0$	$1,38 \pm 1,95$
Fucoxantina	$3,39 \pm 4,79$	$187,37 \pm 264,97$	$100,25 \pm 78,23$	$623,45 \pm 374,47$	$37,97 \pm 50,48$
Emodin (mSigma 13,8)	$778,47 \pm 59,4$	$10,94 \pm 2,05$	$19,88 \pm 1,85$	$1,73 \pm 0,84$	$2,41 \pm 0,29$
Emodin (mSigma 1,7)	$1977,94 \pm 89,95$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$

Sobre ambos pigmentos carotenoides, fucoxantina es un pigmento resistente a oxidación, ya encontrado en altas cantidades tanto en *D. antarctica* como *M. pyrifera* y en organismos marinos [39], por lo que para futuros trabajos, se propone optimizar todos los protocolos hacia la extracción de  $\beta$ -caroteno y apocarotenal, al mismo tiempo que detectar si el hongo produce directamente apocarotenal o si es producto de la oxidación directa de  $\beta$ -caroteno. Dado que es altamente probable que apocarotenal provenga de  $\beta$ -caroteno, es necesario añadir en los solventes de extracción, antioxidantes como BHT, pyrogallol, ascorbyl o palmitateo y una etapa de saponificación con KOH al 10 % para la biomasa de hongo fermentado en algas pardas, dado que, a pesar de no identificar clorofilas, el análisis UHPLC-QTOF identificó lípidos lo que interfiere con las mediciones, por lo que usar saponificación es recomendable.[2][32] [33]

A pesar de no ser un carotenoide, se destaca que la emodina tiene una alta probabilidad de ser un metabolito secundario producido por el hongo marino y específicamente al fermentar glucosa como única fuente de carbono, la cual tiene intensidades variadas con fuentes de carbono algas pardas, con una menor confianza dado mSigma de 13,8 vs 1,7, mientras que las algas pardas por si solas presentan intensidades casi nulas y nulas con un mSigma de mayor confianza, lo que podría indicar que el hongo marino posee una coloración anaranjada en medios con glucosa generada principalmente por el pigmento emodina más que por  $\beta$ -caroteno o apocarotenal, con lo que se podría deducir que la cantidad de carotenoides cuantificada para el hongo marino que fermentó glucosa podría estar sobreestimado mientras que los valores cuantificados para fermentaciones con algas pardas podría ser acorde a la realidad dado la

ausencia de emodina. También se recalca que la absorbancia máxima es de alrededor de 436 (nm) según [70], similar a carotenoides y congruente con la absorbancia máxima detectada en muestras de hongo marino que fermentó glucosa y no así con fermentación de algas pardas y solo algas pardas. En este caso, la diferencia entre la cuantificación espectrofotométrica inicial y el posterior análisis UHPLC-QTOF subraya la importancia de emplear metodologías complementarias para identificar y cuantificar compuestos. Esto es especialmente importante cuando se trabaja con muestras que contienen diversas especies moleculares dado que la ley de Beer-Lambert es ideal en casos de tener muestras de alta pureza, lo que no fue logrado en este caso.

8'-apo-beta,psi-caroten-8'-al es un pigmento anaranjado derivado de la oxidación directa del  $\beta$ -caroteno por una incisión excéntrica en la posición 8', el cual se estima que al cambiar su configuración, genera mayores interacciones con fases móviles de carácter más polar, dado que es una molécula considerada polar [65][66]. Se reporta mediante bibliografía tiempos de retención de 1 minuto con HPLC y columnas C18 fase reversa y fase móvil de disolvente A de agua desionizada y metanol con acetato de amonio de 10 mM, disolvente B de agua desionizada con 0,01 mM de acetato de amonio y disolvente C MTBE absoluto, siendo una fase móvil con solventes de carácter más polar que la fase móvil utilizada en este estudio (isopropanol, acetona y metanol). Como se mencionó anteriormente, la emodina tiene una absorbancia máxima de 436 (nm) aproximadamente, que concuerda con las absorbancias medidas en fermentación con glucosa e intensidades encontradas en hongo fermentado en glucosa, sin embargo, se reporta que apocarotenal tiene una absorbancia máxima en 412 (nm) que se podría observar en la tendencia de espectro de absorción de hongo marino que fermentó algas pardas. Por último, la bibliografía reporta tiempos de retención para Emodina sobre 10 minutos [70] [71]. En concreto, la forma y diferencias del espectro de absorción por espectrofotometría UV-vis entre el hongo fermentado en glucosa y el hongo fermentado en algas pardas concuerda con las intensidades en UHPLC-QTOF y peaks detectados en HPLC con las características de absorbancia máxima de Emodina y apocarotenal más su presencia o no en distintas muestras. Las pequeñas diferencias en tiempos de retención y absorbancia máxima detectada en la literatura, puede deberse a la fase móvil utilizada, diferencias de equipo, columna C18, interferencias de moléculas en el espectro de absorbancia y también la complejidad de moléculas presentes aparte de apocarotenal.[65]

No se reporta en bibliografía que las vías metabólicas propias de hongos ascomiceto produzcan directamente apocarotenal [2][12] por lo que se estima posible que la oxidación del carotenoide ocurre fuera de la vía metabólica propia del hongo y por consecuencia de la metodología de extracción y posterior manejo del extracto. La presencia de apocarotenal indica que efectivamente hay genes productores de fitoeno desaturasa, fitoeno sintasa y licopeno ciclasa para la producción de  $\beta$ -caroteno, el que también es precursor de fucoxantina dado que ambos pigmentos derivan de la rama de licopeno- $\beta$ -ciclasa o la enzima conocida como LCYB [39], si bien las enzimas para la producción de carotenoides y xantófilas es conocida bibliográficamente, los genes que codifican estas enzimas pueden ser variadas para cada organismo productor de carotenoides y queda para futuros avances en conocimiento de *A. cruciatus* que genes codifican las enzimas necesarias para generar los carotenoides identificados.[37][38][39].

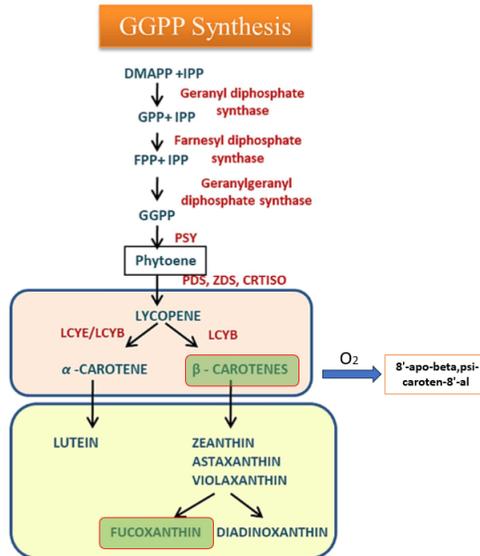


Figura 5.10: Vía metabólica hipotética de *A. cruciatus* para la producción de carotenoides identificados mediante UHPLC-QTOF, esquema perteneciente a[39].

# Capítulo 6

## Conclusiones y Recomendaciones

Se lograron los objetivos específicos de este trabajo llevando a cabo diversas tareas que contribuyeron al avance del conocimiento en la producción de carotenoides en el hongo marino *Asteromyces cruciatus*. Se investigaron los efectos de diferentes longitudes de onda en el crecimiento de *Asteromyces cruciatus* cuando se cultivó con glucosa como única fuente de carbono. Se desarrolló un protocolo de laboratorio para la extracción y caracterización de carotenoides de la fermentación de algas pardas *M. pyrifera* y *D. antarctica* con el hongo marino *Asteromyces cruciatus*. Se realizó una comparación exhaustiva de los carotenoides obtenidos de la asimilación de algas pardas *M. pyrifera* y *D. antarctica* por el hongo *Asteromyces cruciatus*. Este análisis arroja luz sobre las diferencias en la composición y cantidad de carotenoides derivados de diferentes fuentes de algas pardas. Se logró determinar qué alga parda asimilada por el hongo marino posee el mejor rendimiento de producción de carotenoides por peso seco de micelio logrando identificar fuentes ideales de materia prima para la producción de carotenoides y dado la identificación de los carotenoides obtenidos se logró la determinación teórica básica de las posibles rutas metabólicas para la producción de carotenoides en el hongo marino.

Este enfoque proporcionó una comprensión más profunda de los procesos biológicos involucrados en la síntesis de estos pigmentos esenciales además de la especificidad de producción, por lo que, finalmente se logra el objetivo general de comparar los carotenoides obtenidos por asimilación de algas pardas *M. pyrifera* y *D. antarctica* por el hongo marino *Asteromyces cruciatus* por medio de técnicas como espectrofotometría, Cromatografía líquida de alta presión y estudio de metabolómica.

El presente estudio revela el tipo y especificidad de carotenoides que puede ser producido por el hongo marino *A. cruciatus* en medios con única fuente de carbono algas pardas *D. antarctica* y *M. pyrifera*, los cuales son apocarotenal y fucoxantina. Si bien no hay diferencias significativas en el análisis estadístico en el contenido de apocarotenal mediante espectrofotometría UV-Vis, es importante recalcar que ambas mediciones de intensidades en UHPLC-QTOF de apocarotenal en *A. cruciatus* que fermentó el alga *D. antarctica* son mayores que en *A. cruciatus* que fermentó el alga *M. pyrifera*, intensidades que no se registraron con tal magnitud en solo algas pardas, con lo que se concluye que el alga parda *D. antarctica* es una fuente de carbono que podría generar un mayor rendimiento de apocarotenal, basándose en mediciones de HPLC, UHPLC y espectrofotometría. Por otro lado, tanto mediciones revisadas por separado y en análisis estadísticos indican que no hay una diferencia significa-

tiva en rendimiento de fucoxantina dependiendo de que alga parda fermenta el hongo marino.

La comparación de dos metodologías de extracción de carotenoides ha arrojado resultados que respaldan la elección de una metodología que involucra la ruptura mecánica de la biomasa liofilizada. Los análisis realizados mediante UHPLC-QTOF han proporcionado una visión más detallada de los carotenoides extraídos, señalando la necesidad de mejoras en la metodología seleccionada. En conjunto con los hallazgos anteriores, es imperativo destacar la importancia del manejo y cuidado meticuloso de las muestras a analizar tanto en HPLC como en UHPLC-QTOF. La preservación adecuada de las muestras desde la extracción hasta el análisis es esencial para evitar posibles oxidaciones y degradaciones de carotenoides.

Además de las consideraciones anteriores, resulta altamente propicio explorar enfoques de metabolómica en organismos poco explorados. Este enfoque permitiría un entendimiento más completo de la interacción entre el hongo y las fuentes de carbono que consume, allanando el camino para el desarrollo de metodologías específicas para la extracción y cuantificación de metabolitos particulares y de interés. En este contexto, es esencial mencionar que si bien se ha observado la producción de apocarotenal por parte del hongo, la cantidad significativamente mayor de una antraquinona, un pigmento fúngico policétido, merece atención. Este hallazgo sugiere la posibilidad de optimizar la producción de emodina por sobre apocarotenal al emplear fuentes de carbono ricas en azúcares simples, como la glucosa, dado que los resultados indican que emodina no es sintetizado con algas pardas como fuente de carbono.

La perspectiva de maximizar el rendimiento de compuestos valiosos como la emodina, aporta un camino potencialmente prometedor para futuras investigaciones y aplicaciones en el ámbito de la bioproduktividad y las rutas metabólicas en hongos marinos poco explorados. En última instancia, la integración de estas mejoras metodológicas y precauciones analíticas potenciaría la calidad y confiabilidad de las investigaciones y comparaciones futuras.

# Bibliografía

- [1] L. C. M. Elena, «Desarrollo de un método integrado para la utilización de macroalgas y residuos de la industria de las macroalgas para crecer biomasa fúngica para obtención de bioproductos», 2020. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/177851>
- [2] C. Echavarri-Erasun y E. A. Johnson, «Fungal carotenoids», en Applied Mycology and Biotechnology, 2002, pp. 45-85. doi:10.1016/s1874-5334(02)80006-5
- [3] Ruralbit, «CYTED». <https://www.cytel.org/es/biblioteca/carotenoides-en-agroalimentaci%C3%B3n-y-salud>
- [4] S. Tiwari, P. Yawale, y N. Upadhyay, «Carotenoids: Extraction strategies and potential applications for valorization of under-utilized waste biomass», Food bioscience, vol. 48, p. 101812, ago. 2022, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101812>
- [5] R. Saini et al., «Carotenoids: Dietary Sources, Extraction, Encapsulation, Bioavailability, and Health Benefits—A Review of Recent Advancements», Antioxidants, vol. 11, n.o 4, p. 795, abr. 2022, doi:10.3390/antiox11040795.
- [6] R. Panikkar y D. J. Brasch, «Composition and block structure of alginates from New Zealand brown seaweeds», Carbohydrate Research, vol. 293, n.o 1, pp. 119-132, oct. 1996, [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(96\)00193-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(96)00193-0).
- [7] C. Camus, J. Infante, y A. H. Buschmann, «Revisiting the economic profitability of giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Ochrophyta) cultivation in Chile», Aquaculture, vol. 502, pp. 80-86, mar. 2019, doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.030>.
- [8] S. Zuniga-Jara, M. Marin-Riffo, y C. Bulboa-Contador, «Bioeconomic analysis of giant kelp *Macrocystis pyrifera* cultivation (Laminariales; Phaeophyceae) in Northern Chile», Journal of Applied Phycology, vol. 28, n.o 1, pp. 405-416, may 2015, <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0581-x>.
- [9] C. Camus, J. Infante, y A. H. Buschmann, «Revisiting the economic profitability of giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Ochrophyta) cultivation in Chile», Aquaculture, vol. 502, pp. 80-86, mar. 2019,doi:10.1016/j.aquaculture.2018.12.030
- [10] T. B. J. Molelekoa, W. Augustyn, T. Regnier, y L. S. Da Silva, «Chemical characterization and toxicity evaluation of fungal pigments for potential application in food, pharmaceutical and agricultural industries», Saudi Journal of Biological Sciences, vol. 30, n.o 5, p. 103630, may 2023, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103630>
- [11] B. G. Nabi et al., «Natural pigments: anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as colorants in food products», Food bioscience, vol. 52, p. 102403, abr. 2023, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102403>.
- [12] M. A. Toma, Md. M. Rahman, Md. S. Rahman, M. Arif, K. H. M. N. H. Nazir, y L. Dufos-

- sé, «Fungal pigments: carotenoids, riboflavin, and polyketides with diverse applications», *Journal of Fungi*, vol. 9, n.o 4, p. 454, abr. 2023, <https://doi.org/10.3390/jof9040454>
- [13] «Synthetic Pigments - CD BioSciences». <https://www.foodassay.com/synthetic-pigments.htm#:~:text=Synthetic%20pigments%2C%20also%20known%20as,added%20to%20food%20or%20drink.>
- [14] Equipo de Marketing, «Tipos de colorantes artificiales para alimentos y sus usos - Farbe Naturals», *Farbe*, 6 de julio de 2020. <https://farbe.com.mx/tipos-de-colorantes-artificiales-para-alimentos-y-sus-usos/>
- [15] M. Oplatowska, R. F. Donnelly, R. Majithiya, D. G. Kennedy, y C. T. Elliott, «The potential for human exposure, direct and indirect, to the suspected carcinogenic triphenylmethane Dye Brilliant green from green paper towels», *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, n.o 8, pp. 1870-1876, ago. 2011, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.05.005>
- [16] F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi, y E. Gontier, «Production of plant secondary Metabolites: a Historical perspective», *Plant Science*, vol. 161, n.o 5, pp. 839-851, oct. 2001, [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(01)00490-3)
- [17] M. E. Rateb y R. Ebel, «Secondary metabolites of fungi from marine habitats», *Natural Product Reports*, vol. 28, n.o 2, p. 290, ene. 2011, [doi:10.1039/C0NP00061B](https://doi.org/10.1039/C0NP00061B)
- [18] C. Schmidt-Dannert, «Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi», en *Springer eBooks*, 2014, pp. 19-61. [https://doi.org/10.1007/10\\_2014\\_283](https://doi.org/10.1007/10_2014_283)
- [19] V. Shete y L. Quadro, «Mammalian metabolism of *B*-Carotene: Gaps in knowledge», *Nutrients*, vol. 5, n.o 12, pp. 4849-4868, nov. 2013, <https://doi.org/10.3390/nu5124849>.
- [20] M. E. V. Arellano, «Producción de pigmentos por *monascus* spp. en medio sólido empleando residuos agroindustriales», 2016. <https://www.redalyc.org/journal/674/67449381012/html/>
- [21] C. Lourenço-Lopes et al., «Carotenoids as natural colorful additives for the food industry», en *IntechOpen eBooks*, 2021. <https://www.intechopen.com/chapters/79447>
- [22] E. Jacob-Lopes, M. I. Queiroz, y L. Q. Zepka, *Pigments from Microalgae Handbook*. Springer Nature, 2020.
- [23] K. Y. Joshi, P. Kumar, y R. Kataria, «Microbial carotenoid production and their potential applications as antioxidants: A current update», *Process Biochemistry*, vol. 128, pp. 190-205, may 2023, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511323000600#bib46>
- [24] M. Bin-Jumah, S. Alwakeel, M. Moga, L. Buvnariu, N. Bigiu, y M. Zia-Ul-Haq, «Application of carotenoids in cosmetics», en *Springer eBooks*, 2021, pp. 747-756. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-46459-2\\_24](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-46459-2_24)
- [25] A. V. Rao y L. G. Rao, «Carotenoids and human health», *Pharmacological Research*, vol. 55, n.o 3, pp. 207-216, mar. 2007, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.012>
- [26] S. Voutilainen, T. Nurmi, J. Mursu, y T. H. Rissanen, «Carotenoids and cardiovascular health», *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 83, n.o 6, pp. 1265-1271, jun. 2006, <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1265>
- [27] A. Kaulmann y T. Bohn, «Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention», *Nutrition Re-*

- search, vol. 34, n.o 11, pp. 907-929, nov. 2014, <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.07.010>
- [28] «Espectrometría de masas», SERVICIOS CENTRALES DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN. <https://www.scai.uma.es/areas/aqcm/ems/ems.html>
- [29] B. Li, A. Gorusupudi, R. Arunkumar, y P. S. Bernstein, «Extraction, detection, and imaging of the macular carotenoids», en *Methods in Enzymology*, 2022, pp. 185-213. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2022.05.001>
- [30] T. Lorand, J. Deli, P. Molnár, y G. Tóth, «FT-IR study of some carotenoids», *ResearchGate*, jun. 2002, [doi:10.1002/1522-2675\(200206\)85:6](https://doi.org/10.1002/1522-2675(200206)85:6).
- [31] A. M. LaFountain, C. Pacheco, R. O. Prum, y H. A. Frank, «Nuclear magnetic resonance analysis of carotenoids from the burgundy plumage of the pompadour cotinga (*Xipholena punicea*)», *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 539, n.o 2, pp. 133-141, nov. 2013, [doi:10.1016/j.abb.2013.08.012](https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.08.012).
- [32] Liu, Chang, Bin Hu, Yuliang Cheng, Yahui Guo, Weirong Yao y He Qian. «Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments». *Bioresource Technology* 337 (octubre de 2021): 125398. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125398>.
- [33] Rodríguez-Amaya, Delia B. and Masanori Kimura. “HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis.” (2004).
- [34] K. Miyashita, S. Nishikawa, y M. Hosokawa, «Therapeutic effect of fucoxanthin on metabolic syndrome and type 2 diabetes», en Elsevier eBooks, 2018, pp. 343-355. [doi:10.1016/b978-0-12-812019-4.00027-1](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812019-4.00027-1).
- [35] Dissertation, M. Fleshman, E. H. Harrison, y O. Ziouzenkova, «B-Carotene absorption and metabolism», *ResearchGate*, oct. 2023, [En línea]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/267398230\\_b-Carotene\\_Absorption\\_and\\_Metabolism](https://www.researchgate.net/publication/267398230_b-Carotene_Absorption_and_Metabolism)
- [36] G. Sandmann, «Carotenoids and their biosynthesis in fungi», *Molecules*, vol. 27, n.o 4, p. 1431, feb. 2022, <https://doi.org/10.3390/molecules27041431>
- [37] E. Wang, C. Dong, P. Zhang, T. H. Roberts, y R. Park, «Carotenoid biosynthesis and the evolution of carotenogenesis genes in rust fungi», *Fungal Biology*, vol. 125, n.o 5, pp. 400-411, may 2021, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.12.005>.
- [38] X.-Y. Xu, L. Tian, J. Xu, C. Xie, L. Jiang, y H. Huang, «Analysis and expression of the carotenoid biosynthesis genes from *Deinococcus wulumuqiensis* R12 in engineered *Escherichia coli*», *AMB Express*, vol. 8, n.o 1, jun. 2018, <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0624-1>
- [39] V. Ashokkumar et al., «Technological Advances in the production of carotenoids and their applications– A critical review», *Bioresource Technology*, vol. 367, p. 128215, ene. 2023, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128215>
- [40] M. A. Toma, Md. M. Rahman, Md. S. Rahman, M. Arif, K. H. M. N. H. Nazir, y L. Dufosé, «Fungal pigments: carotenoids, riboflavin, and polyketides with diverse applications», *Journal of Fungi*, vol. 9, n.o 4, p. 454, abr. 2023, <https://doi.org/10.3390/jof9040454>
- [41] J. Sharifi-Rad et al., «Recent advances in the therapeutic potential of Emodin for human health», *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 154, p. 113555, oct. 2022, doi:

10.1016/j.biopha.2022.113555.

- [42] M. Butnariu, «Methods of analysis (Extraction, separation, identification and quantification) of carotenoids from natural products», *Journal of Ecosystem and Ecography*, vol. 6, n.o 2, ene. 2016, doi:10.4172/2157-7625.1000193
- [43] E. Wang, C. Dong, R. Park, y T. H. Roberts, «Carotenoid pigments in rust fungi: extraction, separation, quantification and characterisation», *Fungal Biology Reviews*, vol. 32, n.o 3, pp. 166-180, jun. 2018, doi:10.1016/j.fbr.2018.02.002
- [44] Z. Yun-Feng et al., «Enhancement of carotenoid production and its regulation in edible mushroom cordyceps militaris by abiotic stresses», *Enzyme and microbial technology*, vol. 148, p. 109808, ago. 2021, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109808>.
- [45] M. A. Borowitzka, «Carotenoid production using microorganisms», en Elsevier eBooks, 2010, pp. 225-240. doi:10.1016/b978-1-893997-73-8.50015-3
- [46] F. Mantzouridou, E. Naziri, y M. Z. Tsimidou, «Industrial glycerol as a supplementary carbon source in the production of *B*-Carotene by *Blakeslea Trispora*», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, n.o 8, pp. 2668-2675, mar. 2008, doi:10.1021/jf703667d
- [47] Y. Hirono-Hara, A. Kato, Y. Mizutani, H. Kikukawa, y K. Y. Hara, «Effect of spent coffee grounds extract on astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*», *Bioresource Technology Reports*, vol. 17, p. 100953, feb. 2022, <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.100953>
- [48] «Evaluación de medios de cultivo para la producción de astaxantina a partir de *Xanthophyllomyces dendrorhous* R4», Tesis, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, 2016. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/2528/SSIT0014348.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [49] C. Kanmanee et al., «Effects of dietary supplementation with red yeast (*Sporidiobolus pararoseus*) on productive performance, egg quality, and duodenal cell proliferation of laying hens», *Animals*, vol. 12, n.o 3, p. 238, ene. 2022, <https://doi.org/10.3390/ani12030238>
- [50] E. M. Luque et al., «A relationship between carotenoid accumulation and the distribution of species of the fungus *Neurospora* in Spain», *PLOS ONE*, vol. 7, n.o 3, p. e33658, mar. 2012, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033658>
- [51] Z. Aksu y A. T. Eren, «Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source», *Process Biochemistry*, vol. 40, n.o 9, pp. 2985-2991, sep. 2005, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.011>
- [52] K. Y. Joshi, P. Kumar, y R. Kataria, «Microbial carotenoid production and their potential applications as antioxidants: A current update», *Process Biochemistry*, vol. 128, pp. 190-205, may 2023, doi: 10.1016/j.procbio.2023.02.020.
- [53] J. Oliver y A. Palou, «Chromatographic determination of carotenoids in foods», *Journal of Chromatography A*, vol. 881, n.o 1-2, pp. 543-555, jun. 2000, doi:10.1016/s0021-9673(00)00329-0.
- [54] M. Velásquez, C. I. Fraser, W. A. Nelson, F. Tala, y E. C. Macaya, «Concise review of the genus *Durvillaea* Bory de Saint-Vincent, 1825», *Journal of Applied Phycology*, vol. 32, n.o 1, pp. 3-21, ago. 2019, doi:10.1007/s10811-019-01875-w.

- [55] E. Uribe, A. Vega-Gálvez, N. Vargas, A. Pastén, K. Rodríguez, y K. Ah-Hen, «Phytochemical components and amino acid profile of brown seaweed *Durvillaea Antarctica* as affected by air drying temperature», *Journal of Food Science and Technology*, vol. 55, n.o 12, pp. 4792-4801, oct. 2018, <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3412-7>
- [56] M. F. Colombo-Pallotta, E. García-Mendoza, y L. B. Ladah, «PHOTOSYNTHETIC PERFORMANCE, LIGHT ABSORPTION, AND PIGMENT COMPOSITION OF MACROCYSTIS PYRIFERA (LAMINARIALES, PHAEOPHYCEAE) BLADES FROM DIFFERENT DEPTHS 1», *Journal of Phycology*, vol. 42, n.o 6, pp. 1225-1234, dic. 2006, <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00287.x>
- [57] Libretexts, «2.1.5: Spectrophotometry», Chemistry LibreTexts, feb. 2023, [En línea]. Disponible en: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_%28Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry%29/Kinetics/02%3A\\_Reaction\\_Rates/2.01%3A\\_Experimental\\_Determination\\_of\\_Kinetics/2.1.05%3A\\_Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_%28Physical_and_Theoretical_Chemistry%29/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry)
- [58] «Photosynthetic Structures: The purpose of pigments | Biology | Practice | Albert», Albert. <https://www.albert.io/learn/question/biology/photosynthetic-structures-the-purpose-of-pigments>
- [59] M. Krajewska, M. Szymczak-Żyła, y G. Kowalewska, «Carotenoid determination in recent marine sediments - Practical problems during sample preparation and HPLC analysis», *Current Chemistry Letters*, pp. 91-104, ene. 2017, <https://doi.org/10.5267/j.ccl.2017.4.003>
- [60] M. Varzakakou y T. Roukas, «IDENTIFICATION OF CAROTENOIDS PRODUCED FROM CHEESE WHEY BY BLAKESLEA TRISPORAIN SUBMERGED FERMENTATION», *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, vol. 40, n.o 1, pp. 76-82, dic. 2009, [doi:10.1080/10826060903400666](https://doi.org/10.1080/10826060903400666)
- [61] R. W. S. Weber, H. Anke, y P. Davoli, «Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, fungi)», *Journal of Chromatography A*, vol. 1145, n.o 1-2, pp. 118-122, mar. 2007, [doi:10.1016/j.chroma.2007.01.052](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.052)
- [62] P. Davoli, «Identification and quantification of carotenoid pigments in aeciospores of the daisy rust fungus, *Puccinia distincta*», *Phytochemistry*, vol. 60, n.o 3, pp. 309-313, jun. 2002, [doi:10.1016/s0031-9422\(02\)00120-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00120-6)
- [63] R. W. S. Weber, H. Anke, y P. Davoli, «Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, fungi)», *Journal of Chromatography A*, vol. 1145, n.o 1-2, pp. 118-122, mar. 2007, [doi:10.1016/j.chroma.2007.01.052](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.052)
- [64] P. Regal, A. Lamas, C. Fente, C. Franco, y A. Cepeda, «Analysis and metabolomics of carotenoids», en Elsevier eBooks, 2020. [doi:10.1016/b978-0-12-817067-0.00006-3](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817067-0.00006-3)
- [65] A. Zeb y A. Hussain, «Chemo-metric analysis of carotenoids, chlorophylls, and antioxidant activity of *trifolium hybridum*», *Heliyon*, vol. 6, n.o 1, p. e03195, ene. 2020, [doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03195](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03195).
- [66] PubChem, «Apocarotenal», PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Apocarotenal>

- [67] P. Velmurugan, Y. H. Lee, C. K. Venil, P. Lakshmanaperumalsamy, J.-C. Chae, y B.-T. Oh, «Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium», *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 109, n.o 4, pp. 346-350, abr. 2010, [doi:10.1016/j.jbiosc.2009.10.003](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.10.003)
- [68] P. D. Villarreal, M. Carrasco, S. Barahona, J. Alcaíno, V. Cifuentes, y M. Baeza, «Tolerance to ultraviolet radiation of psychrotolerant yeasts and analysis of their carotenoid, mycosporine, and ergosterol content», *Current Microbiology*, vol. 72, n.o 1, pp. 94-101, oct. 2015, <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-015-0928-1>
- [69] PubChem, «PubChem», PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [70] L. Peng et al., «Rapid and Simple Method for the Determination of Emodin in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to a Diode Array Detector», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, n.o 4, pp. 854-857, ene. 2013, [doi:10.1021/jf304804c](https://doi.org/10.1021/jf304804c).
- [71] P. Alam, O. M. Noman, R. N. Herqash, O. M. Almarfadi, A. Ali, y A. S. Alqahtani, «Response Surface Methodology (RSM)-Based optimization of Ultrasound-Assisted extraction of Sennoside A, sennoside B, Aloe-Emodin, emodin, and chrysophanol from senna alexandrina (Aerial parts): HPLC-UV and antioxidant analysis», *Molecules*, vol. 27, n.o 1, p. 298, ene. 2022, [doi:10.3390/molecules27010298](https://doi.org/10.3390/molecules27010298).
- [72] GraphPad Software, LLC, «GraphPad Prism 10 Statistics Guide - Interpreting Results: Welch and Brown-Forsythe Tests». [https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/interpreting\\_welch\\_browne-forsythe\\_tests.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/interpreting_welch_browne-forsythe_tests.htm)

# Anexos

## Anexo A. Protocolo y resultados de extracción, calentamiento con ácido

### A.1. Protocolo de extracción de carotenoides, método por calentamiento con ácido.

Protocolo por comunicación personal de M. Paz Gonzales. 2022.  
Se comienza el protocolo con micelio liofilizado de *A. cruciatus* que creció en medios con Glucosa, *M. pyrifera* y *D. Antarctica*

Se masas 0,15 (g) de biomasa a extraer en tubos Falcon de 15 (ml) y se agrega 2,25 (ml) de *NaOH* 1,5 (M) y se homogeniza en vortex por 20 segundos. Se deja macerar por 2 horas a 30°C en un agitador a 200 (rpm), luego se centrifuga por 15 minutos a 12000 (g) a una temperatura de 15°C, para luego separar sobrenadante con pipeta, el cual se descarta. Se lava el pellet con agua destilada homogenizando con vortex y luego se centrifuga por 10 minutos a 12000 (g) a 15°C, se separa pellet del sobrenadante y se repite el lavado con agua destilada por 3 veces.

Una vez terminado el lavado de pellet con el fin de eliminar los restos de *NaOH*, los tubos Falcon se revisten con Foil para evitar contacto con la luz, y se agrega 2,25 (ml) de solvente de acetona:petróleo éter (4:1,v:V). Se homogeniza pellet con solvente en vortex por 20 (s) y se macera en agitador a 200 (rpm) por 30 minutos a 30°C para luego centrifugar a 12000 (G) por 15 minutos a 15°C. Con una pipeta se separa sobrenadante de pellet y se trasvasa a un nuevo tubo Falcon de 15 ml previamente revestido con Foil, después de ser filtrado con una jeringa y filtro de 0,45 ( $\mu m$ ), se repite la adición de solvente y siguientes pasos descritos 2 veces para generar el resto de volumen de extracto, o se repiten pasos hasta que pellet se vea incoloro.

#### Identificación con Espectrofotómetro:

Se miden 0,8 (ml) de acetona éter petróleo (4:1,v:v) y 0,2 (ml) de extracto de cada una de las muestras para producir 1 (ml) de muestra, dilución (4:1,v:v) En una cuba de cuarzo se coloca 1 (ml) de blanco y en otra cuba se coloca 1 (ml) de muestra previamente preparada. Se mide absorbancia de 430 (nm) a 460 (nm) con equipo ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS GENESYS™ 10, THERMO.

## A.2. Datos obtenidos

En la tabla A.1 se puede observar la masa utilizada y el volumen extraído para medición de carotenoides. En la tabla A.2 se pueden observar los datos de absorbancia medido a distintas longitudes de onda.

Tabla A.1: Muestra utilizada en gramos y ml de volumen extraído para cada muestra.

A. Cruciatus + Glucosa		A. Cruciatus + M. pyriferá		A. Cruciatus + D. Antártica	
(g)	0,152	(g)	0,1502	(g)	0,1504
(ml)	5,5	(ml)	5,4	(ml)	5,25

Tabla A.2: Absorbancias obtenidas por espectrofotómetro para diferentes muestras

A. Cruciatus + Glucosa		A. Cruciatus + M. pyriferá		A. Cruciatus + D. Antártica	
(nm)	(A)	(nm)	(A)	(nm)	(A)
430	1,119	430	0,885	430	0,775
440	1,152	440	0,453	440	0,413
450	1,083	450	0,294	450	0,276
460	0,981	460	0,214	460	0,203

### A.3. Memoria de calculo y resultados

El contenido total de carotenoides se calcula usando la siguiente formula. [33]:

$$\frac{A_{total} \cdot V(ml) \cdot D \cdot 10^4}{A_{1\%} \cdot W(g)}$$

Donde  $A_{total}$  es la observancia obtenida,  $V$  (ml) es el volumen total extraído,  $D$  es la dilución de la muestra,  $W$  es la biomasa extraída en (gr) y  $A_{1\%}$  es el coeficiente de absorción de 2500 recomendado para mezclas de solvente [44]. El resultado final es en ( $\mu g/g$ ) de carotenos en muestra total.

Usando los valores de absorbancia obtenidos para 450 (nm) se obtienen los siguientes resultados de carotenoides totales en cada muestra, los cuales se pueden ver en la tabla A.3.

Tabla A.3: Contenido de carotenoides total obtenido de micelio de *A. cruciatus* fermentado en medios de glucosa, *M. Pyrifera* y *D. antarctica*.

A. Cruciatius + Glucosa	A. Cruciatius + M. pyrifera	A. Cruciatius + D. antarctica
C. Content [ $\mu g/g$ ]	C. Content [ $\mu g/g$ ]	C. Content [ $\mu g/g$ ]
627,00	169,12	154,15

## Anexo B. Crecimiento de hongo marino con estrés abiótico

### B.1. Datos obtenidos

En la tabla B.1 se puede observar los resultados de biomasa obtenida de la fermentación de *A. cruciatus* con única fuente de carbono glucosa y distintas longitudes de onda como estrés abiótico.

Tabla B.1: Masa obtenida para fermentación de *A. cruciatus* expuesto a diferentes longitudes de onda durante su crecimiento.

Muestra	Luz azul (mg/ml)	Luz roja (mg/ml)	Luz blanca (mg/ml)	Control (sin luz) (mg/ml)
1	14,200	11,080	14,240	11,920
2	11,940	11,040	13,040	12,220
3	11,240	13,340	13,580	12,060
Desv. Est	1,547	1,317	0,601	0,150
Promedio	12,460	11,820	13,620	12,067

### B.2. Resultados test ANOVA unidireccional

Dado que las poblaciones de datos, entendiendo por población de resultados de concentración de una longitud de onda específica (rojo, azul, blanco, sin luz) tienen desviaciones estándar distintas, como se ve en B.1, no cumpliendo con una distribución Gaussiana, se utiliza test *Brown Forsthsythe y Welch*, ya que este estudio no supone que los grupos son muestreados a partir de poblaciones con varianzas iguales. El valor P comprueba la hipótesis nula de que los datos en los grupos tienen medias idénticas, de ser medias distintas dando un valor P pequeño ( $P < 0,05$ ) es poco probable que los datos se deban a un muestreo aleatorio y que al menos una media difiere significativamente del resto. En la tabla B.2 se pueden ver los resultados de esta prueba la cual indica que no hay diferencias significativas entre las poblaciones de datos obteniendo un valor  $P > 0,05$  para la prueba Brown-Forsythe y para la prueba Welch [72].

Tabla B.2: Resultados de test ANOVA para datos de fermentación a distintas longitudes de onda

Test ANOVA Brown-Forsythe	
F* (DFn, DFd)	1,690 (3,000, 4,590)
Valor P	0,2915
Diferencias significativas entre prom. ( $P < 0.05$ )?	No
Test Welch ANOVA	
W (DFn, DFd)	4,630 (3,000, 3,505)
Valor P	0,1008
Valor P resumen	ns
Diferencias significativas entre prom. ( $P < 0.05$ )?	No

En específico se tienen las comparaciones múltiples de Games-Howell que se utilizan para comparar dos poblaciones con varianzas distintas, el cual tiene como fin identificar el intervalo de confianza al 95 % y según el resultado de P se puede confirmar que poblaciones son significativamente distintas. En la tabla B.3 se pueden observar los resultados de las comparaciones múltiples, resultando en valores de  $P > 0,05$  y por consecuencia estadísticamente con diferencias no significantes entre poblaciones.

Tabla B.3: Resultados de test de comparación múltiple de Games-Howell entre dos grupos para todos los grupos de estudio.

Test de comparación múltiple de Games-Howell	Diff prom.	95,00 % IC diff prom.	Significante?	Valor P ajustado
Control vs. Luz azul	-0,3933	-6,483 to 5,697	No	0,9661
Control vs. Luz roja	0,2467	-4,906 to 5,399	No	0,9855
Control vs. Luz blanca	-1,553	-3,745 to 0,6381	No	0,1016
Luz azul vs. Luz roja	0,64	-4,196 to 5,476	No	0,9429
Luz azul vs. Luz blanca	-1,16	-6,329 to 4,009	No	0,6672
Luz roja vs. Luz blanca	-1,8	-6,040 to 2,440	No	0,3206

## Anexo C. Datos y resultados extracción mecánica

### C.1. Datos de experiencias de extracción

Tabla C.1: 1.- Datos extracción de biomasa liofilizada y contenido de carotenoides calculado en base a resultados de absorbancia obtenidos a 450 (nm) con ley de Beer-Lambert

Biomasa	<i>A. cruciatus + M. pyrifer</i>	<i>A. cruciatus + D. antarctica</i>	<i>M. pyrifer</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>A. cruciatus + glucosa</i>
Masa inicial (g)	0,0305	0,0301	0,0307	0,0306	0,0302
Vol final ext (ml)	1	1	1	1	1
Factor dilución	10	10	10	10	40
Absorbancia					
nm	<i>A. cruciatus + M. pyrifer</i>	<i>A. cruciatus + D. antarctica</i>	<i>M. pyrifer</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>A. cruciatus + glucosa</i>
400	0,276	0,091	0,101	0,128	0,942
433	0,163	0,053	0,064	0,091	1,131
448	0,115	0,034	0,052	0,085	1,1055
450	0,11	0,032	0,051	0,084	1,043
460	0,091	0,023	0,045	0,077	0,966
500	0,067	0,011	0,04	0,068	0,483
Contenido Carotenoides (ug/g)					
nm	<i>A. cruciatus + M. pyrifer</i>	<i>A. cruciatus + D. antarctica</i>	<i>M. pyrifer</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>A. cruciatus + glucosa</i>
450	144,262	42,525	66,450	109,804	5525,828

Tabla C.2: 2.- Datos extracción de biomasa liofilizada y contenido de carotenoides calculado en base a resultados de absorbancia obtenidos a 450 (nm) con ley de Beer-Lambert

Biomasa	<i>A. cruciatus + M. pyrifer</i>	<i>A. cruciatus + D. antarctica</i>	<i>M. pyrifer</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>A. cruciatus + glucosa</i>
Masa inicial (g)	0,0305	0,0306	0,031	0,0309	0,0303
Vol final ext (ml)	1,2	1	1,25	1	1,25
Factor dilución	10	10	10	10	80
Absorbancia					
nm	<i>A. cruciatus + M. pyrifer</i>	<i>A. cruciatus + D. antarctica</i>	<i>M. pyrifer</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>A. cruciatus + glucosa</i>
400	0,412	0,328	0,63	0,36	0,214
433	0,06	0,074	0,098	0,068	0,438
448	0,022	0,038	0,02	0,028	0,398
450	0,02	0,036	0,016	0,026	0,32
465	0,018	0,032	0,01	0,024	0,28
470	0,02	0,034	0,008	0,024	0,24
Contenido Carotenoides (ug/g)					
nm	<i>A. cruciatus + M. pyrifer</i>	<i>A. cruciatus + D. antarctica</i>	<i>M. pyrifer</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>A. cruciatus + glucosa</i>
450	31,475	47,059	25,806	33,657	4224,422

Tabla C.3: 3.-Datos extracción de biomasa liofilizada y contenido de carotenoides calculado en base a resultados de absorbancia obtenidos a 450 (nm) con ley de Beer-Lambert

Biomasa	<i>A. cruciatus + M. pyrifer</i>	<i>A. cruciatus + D.antarctica</i>	<i>M. pyrifer</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>A. cruciatus + glucosa</i>
Masa inicial (g)	0,0314	0,0312	0,0317	0,0315	0,0303
Vol final ext (ml)	1,1	1,2	1,1	1,2	2,2
Factor dilución	4	4	4	4	40
Absorbancia					
nm	<i>A. cruciatus + M. pyrifer</i>	<i>A. cruciatus + D.antarctica</i>	<i>M. pyrifer</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>A. cruciatus + glucosa</i>
400	0,296	0,312	0,234	0,309	0,942
420	0,23	0,257	0,178	0,248	-
430	0,142	0,191	0,103	0,167	1,131
440	0,11	0,165	0,075	0,138	1,1055
450	0,099	0,154	0,065	0,1285	1,043
460	0,093	0,147	0,061	0,1225	0,966
470	0,091	0,143	0,058	0,119	-
500	0,092	0,138	0,062	0,117	0,483
Contenido Carotenoides (ug/g)					
nm	<i>A. cruciatus + M. pyrifer</i>	<i>A. cruciatus + D.antarctica</i>	<i>M. pyrifer</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>A. cruciatus + glucosa</i>
450	55,490	94,769	36,088	78,324	5963,370

Tabla C.4: 4.- Datos extracción de biomasa liofilizada y contenido de carotenoides calculado en base a resultados de absorbancia obtenidos a 450 (nm) con ley de Beer-Lambert

Biomasa	<i>A. cruciatus + M. pyrifer</i>	<i>A. cruciatus + D.antarctica</i>	<i>M. pyrifer</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>A. cruciatus + glucosa</i>
Masa inicial (g)	0,0314	0,0311	0,0317	0,0315	0,0303
Vol final ext (ml)	1,2	1,25	1	1,1	1,6
Factor dilución	4	4	4	4	40
Absorbancia					
nm	<i>A. cruciatus + M. pyrifer</i>	<i>A. cruciatus + D.antarctica</i>	<i>M. pyrifer</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>A. cruciatus + glucosa</i>
400	0,223	0,282	0,305	0,356	0,49
420	0,169	0,229	0,225	0,269	-
430	0,095	0,158	0,115	0,156	0,838
440	0,069	0,131	0,075	0,111	0,77
450	0,06	0,121	0,063	0,098	0,757
460	0,056	0,115	0,058	0,093	0,68
470	0,055	0,111	0,056	0,088	-
500	0,058	0,11	0,065	0,093	-
Contenido Carotenoides (ug/g)					
nm	<i>A. cruciatus + M. pyrifer</i>	<i>A. cruciatus + D.antarctica</i>	<i>M. pyrifer</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>A. cruciatus + glucosa</i>
450	36,688	77,814	31,798	54,756	6395,770

## Anexo D. Análisis de datos

## D.1. Poblaciones incluyendo grupo control

Tabla D.1: Resultados de prueba Brown-Forsythe ANOVA de comparaciones entre contenido de carotenoide de biomásas extraída, indicando que hay un grupo que es significativamente diferente.

Test ANOVA Brown-Forsythe	
F* (DFn, DFd)	135,9 (4,000, 3,033)
Valor P	0,001
Valor P resumen	***
Diferencias significativas entre prom. ( $P < 0.05$ )?	Si
Test Welch ANOVA	
W (DFn, DFd)	27,58 (4,000, 7,134)
Valor P	0,0002
Valor P resumen	***
Diferencias significativas entre prom. ( $P < 0.05$ )?	Si

Tabla D.2: Comparaciones múltiples de Games-Howell con valor P ajustado para cada par de grupos comparados y valor de intervalo de confianza.

Test de comparación múltiple de Games-Howell	Diff prom.	95,00 % IC diff prom.	Significante?	Resumen	Valor P ajustado
A.C+Glucosa vs. A.C+D.antarctica	5455	2979 to 7931	Yes	**	0,0053
A.C+Glucosa vs. A.C+M. pyriferá	5454	2983 to 7924	Yes	**	0,0052
A.C+Glucosa vs. D. antarctica	5451	2976 to 7927	Yes	**	0,0053
A.C+Glucosa vs. M. pyriferá	5481	3003 to 7958	Yes	**	0,0053
A.C+D.antarctica vs. A.C+M. pyriferá	-1,442	-126,3 to 123,4	No	ns	>0,9999
A.C+D.antarctica vs. D. antarctica	-3,597	-82,55 to 75,36	No	ns	0,9997
A.C+D.antarctica vs. M. pyriferá	25,46	-34,35 to 85,26	No	ns	0,5253
A.C+M. pyriferá vs. D. antarctica	-2,155	-126,1 to 121,8	No	ns	>0,9999
A.C+M. pyriferá vs. M. pyriferá	26,9	-101,9 to 155,7	No	ns	0,8569
D. antarctica vs. M. pyriferá	29,05	-47,97 to 106,1	No	ns	0,5776

## D.2. Poblaciones sin grupo control

Tabla D.3: Resultados de prueba Brown-Forsythe ANOVA de comparaciones entre contenido de carotenoide de biomásas extraída excluyendo grupo control, indicando que no hay diferencias significativas.

Test ANOVA Brown-Forsythe	
F* (DFn, DFd)	0,6234 (3,000, 7,405)
Valor P	0,621
Valor P resumen	ns
Diferencias significativas entre prom. ( $P < 0.05$ )?	No
Test Welch ANOVA	
W (DFn, DFd)	1,186 (3,000, 6,345)
Valor P	0,3877
Valor P resumen	ns
Diferencias significativas entre prom. ( $P < 0.05$ )?	No

Tabla D.4: Comparaciones múltiples de Games-Howell con valor P ajustado para cada par de grupos comparados y valor de intervalo de confianza excluyendo grupo control.

Test de comparación múltiple de Games-Howell	Diff prom.	95,00% IC diff prom.	Significante?	Resumen	Valor P ajustado
A.C+D.antarctica vs. A.C+M. pyrifera	-1,442	-115,9 to 113,1	No	ns	>0,9999
A.C+D.antarctica vs. D. antarctica	-3,597	-76,37 to 69,18	No	ns	0,9979
A.C+D.antarctica vs. M. pyrifera	25,46	-29,64 to 80,56	No	ns	0,4269
A.C+M. pyrifera vs. D. antarctica	-2,155	-116,1 to 111,8	No	ns	0,9999
A.C+M. pyrifera vs. M. pyrifera	26,9	-90,89 to 144,7	No	ns	0,7748
D. antarctica vs. M. pyrifera	29,05	-41,71 to 99,81	No	ns	0,4784

## Anexo E. HPLC, Gráficos

### E.1. Análisis y gráficos primera etapa

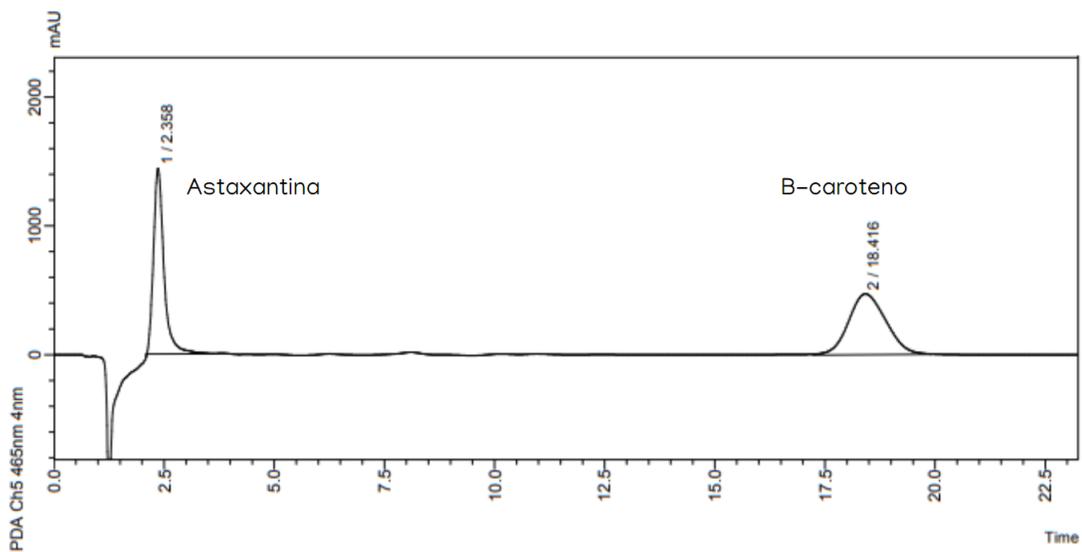


Figura E.1: Estándares de  $\beta$ -caroteno y Astaxantina, medidos a 465 (nm).

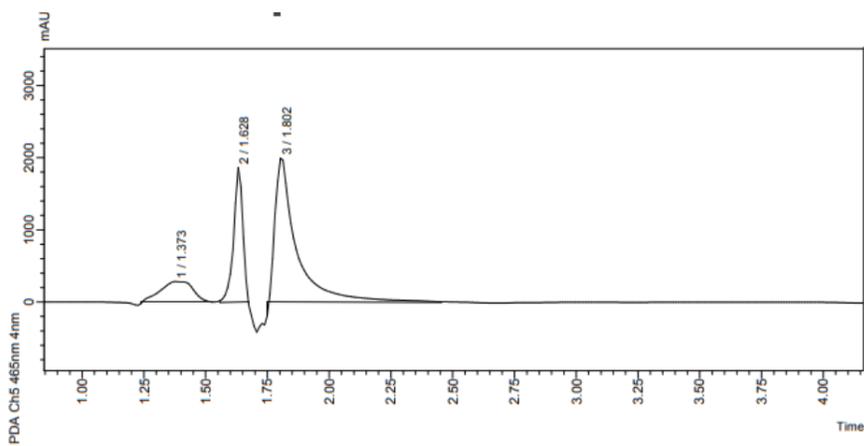


Figura E.2: Analisis de extracto de *A. cruciatus* en medio de glucosa medido a 465 (nm)

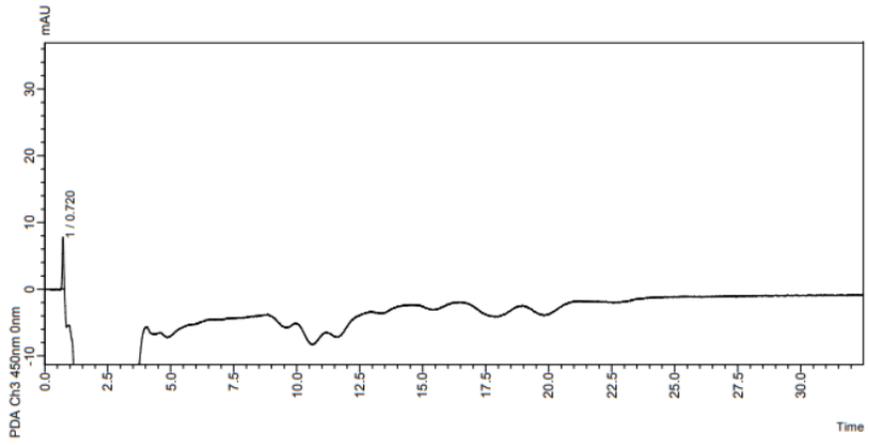


Figura E.3: Extracto de *A. cruciatus* en medio con unica fuente de carbono alga *D. antarctica* medida a 450 (nm)

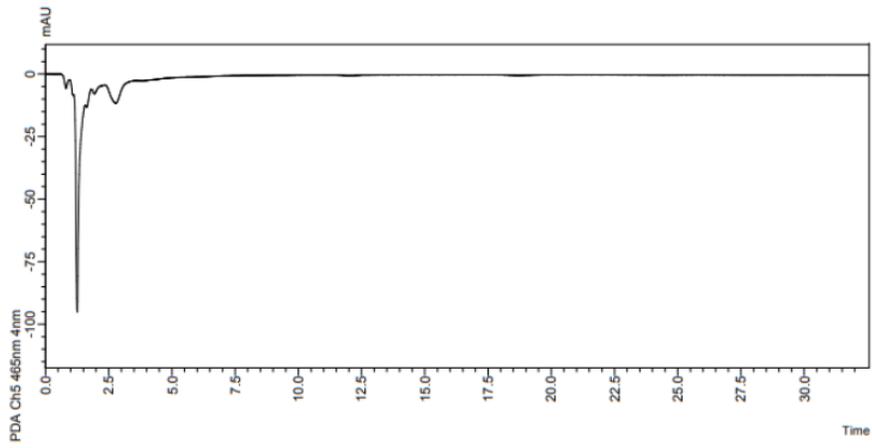


Figura E.4: Extracto de alga parda *D. antarctica* medida a 465 (nm)

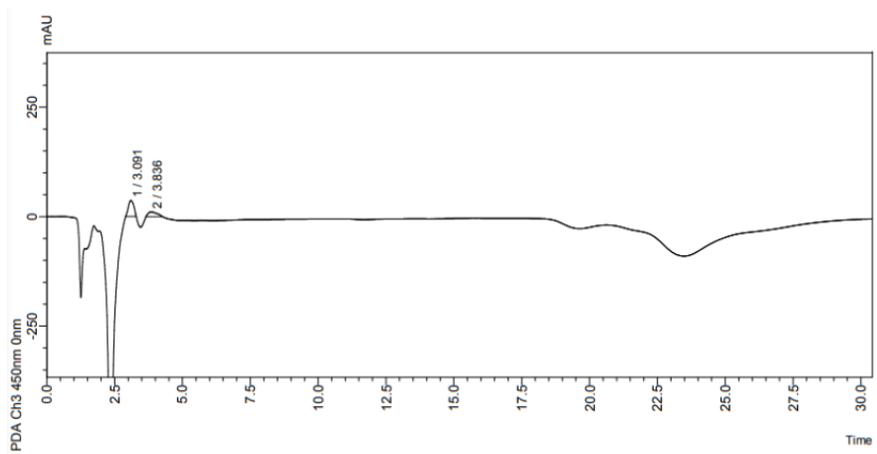


Figura E.5: Extracto de alga parda *D. antarctica* medida a 450 (nm)

## E.2. Analisis y gráficos segunda etapa

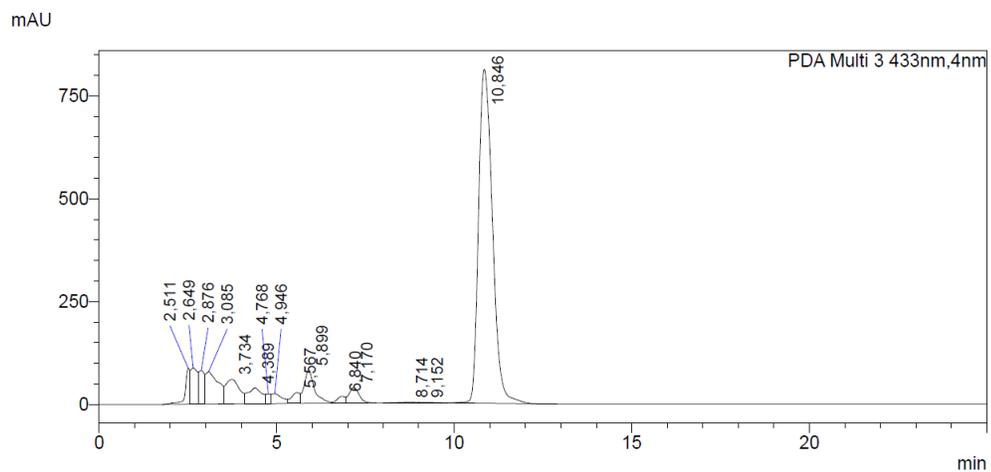


Figura E.6: Estándar de  $\beta$ -caroteno medido a 433 (nm)

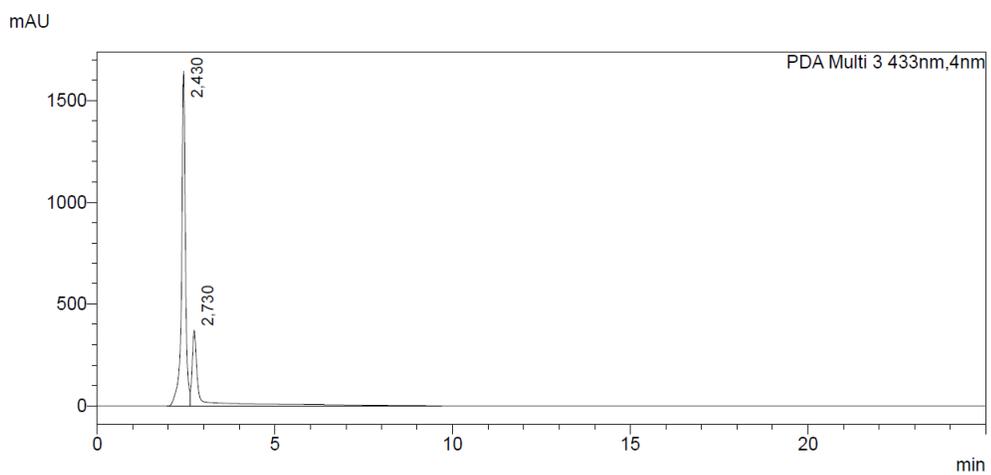


Figura E.7: Extracto de *A. cruciatus* con única fuente de carbono glucosa medido a 433 (nm)

### E.3. Datos de segunda etapa HPLC

Tabla E.1: Datos de intensidad (mAU) y área bajo la curva de análisis HPLC para ambos peaks detectados a diferentes longitudes de onda de extracto de *A. cruciatus* fermentado con glucosa

Peak 1				
(nm)	433	450	454	465
mAU	1645,995	1411,188	1313,274	824,752
Area	12459322	10709840	9983354	6340858
Peak 2				
(nm)	433	450	454	465
mAU	368,54	345,73	331,491	254,391
Area	5588035	5047323	4785493	3416248
Area tot	18047357	15757163	14768847	9757106

## Anexo F. UHPLC-QTOF

Los datos obtenidos por *Metaboscape* son en base a una unidad arbitraria llamada intensidad (I), la cual es directamente proporcional a la concentración que se analiza de la molécula específica, para cuantificaciones, se necesita el analito específico, concentración específica e intensidad específica para luego compararla con una muestra en lo ideal pura con concentración desconocida, la cual se puede calcular teniendo la relación intensidad/concentración conocida. Como el estudio de metabolómica es para identificación de metabolitos, no se puede cuantificar según la intensidad lograda, pero la intensidad medida dentro del mismo estudio se comporta proporcional entre si, es decir si un analito tiene intensidad 100 y otro 50, se puede asegurar que un analito es 2 veces mas concentrado que otro. Como las muestras enviadas son en base una cantidad específica de biomasa extraída, se puede suponer, para este estudio, que la cantidad de metabolitos extraídos es proporcional a la biomasa extraída, así se puede generar comparaciones entre intensidades que asemejen en lo más posible la proporcionalidad. Para esto se divide la intensidad medida de cada molécula por la biomasa extraída, teniendo nuevamente una unidad arbitraria de (intensidad/ $\mu\text{g}$ ) lo cual se logra dividiendo las intensidades en cada columna en la tabla F.2 (*1A.c + Glucosa*) por la masa anotada bajo el mismo nombre en la tabla (*1A.c + Glucosa*) F.1, luego se obtiene como resultado la tabla F.3 la cual se utiliza para las comparaciones y análisis estadístico.

## F.1. Datos de extractos analizados

Tabla F.1: Datos de extractos analizados mediante UHPLC-QTOF

Medida/Muestra	1) <i>A. c + Glucosa</i>	2) <i>A. c + Glucosa</i>	1) <i>A. c + D. antarctica</i>	2) <i>A. c + D. antarctica</i>	1) <i>A. c + M. pyriferu</i>
Masa (ug)	305	300	312	310	310
Extracto (ml)	1,25	1,3	1	1	1
Dilución ext. Seco (ul)	500	500	500	500	500
Inyección (ul)	10	10	10	10	10

Medida/Muestra	2) <i>A. c + M. pyriferu</i>	1) <i>D. antarctica</i>	2) <i>D. antarctica</i>	1) <i>M. pyriferu</i>	2) <i>M. pyriferu</i>
Masa (ug)	315	304	308	310	315
Extracto (ml)	1	1,2	1,2	1,3	1,2
Dilución ext. Seco (ul)	500	500	500	500	500
Inyección (ul)	10	10	10	10	10

Tabla F.2: Datos obtenidos de *Metaboscape* modo positivo, intensidad medida de cada muestra analizada

RT [min]	PM (g/mol)	Nombre	Formula molecular	AQ	mSigma	1) <i>A. c + D. antarctica</i>	2) <i>A. c + D. antarctica</i>	1) <i>A. c + M. pyriferu</i>	2) <i>A. c + M. pyriferu</i>	1) <i>A. c + Glucosa</i>
5,05	270,24	Emodin	C15H10O5	2022	1,7	0,00	0,00	0,00	0,00	583873,00
7,71	270,24	Emodin	C15H10O5	2022	13,8	2961,00	3840,00	6567,00	5757,00	224623,00
10,32	416,6	8'-apo-beta,psi-caroten-8'-al	C30H40O	MANUAL	∞	13295,00	8696,00	5995,00	3369,00	20551,00
11,11	658,91	Fucoanthin	C42H58O6	2022	25,2	116913,00	0,00	48222,00	13927,00	2063,00

RT [min]	PM (g/mol)	Nombre	Formula molecular	AQ	mSigma	2) <i>A. c + Glucosa</i>	1) <i>D. antarctica</i>	2) <i>D. antarctica</i>	1) <i>M. pyriferu</i>	2) <i>M. pyriferu</i>
5,05	270,24	Emodin	C15H10O5	2022	1,7	612462,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7,71	270,24	Emodin	C15H10O5	2022	13,8	246139,00	346,00	713,00	808,00	696,00
10,32	416,6	8'-apo-beta,psi-caroten-8'-al	C30H40O	MANUAL	∞	23495,00	0,00	0,00	854,00	0,00
11,11	658,91	Fucoanthin	C42H58O6	2022	25,2	0,00	270023,00	110467,00	22834,00	716,00

Tabla F.3: Datos obtenidos de *Metaboscape* modo positivo, intensidad normalizada por biomasa extraída (intensidad/ $\mu\text{g}$ ) de cada muestra analizada

RT [min]	PM (g/mol)	Nombre	Formula molecular	AQ	mSigma	1) <i>A. c + D. antarctica</i>	2) <i>A. c + D. antarctica</i>	1) <i>A. c + M. pyriferu</i>	2) <i>A. c + M. pyriferu</i>	1) <i>A. c + Glucosa</i>
5,05	270,24	Emodin	C15H10O5	2022	1,7	0,00	0,00	0,00	0,00	1914,34
7,71	270,24	Emodin	C15H10O5	2022	13,8	9,49	12,39	21,18	18,57	736,47
10,32	416,6	8'-apo-beta,psi-caroten-8'-al	C30H40O	MANUAL	∞	42,61	28,05	19,34	10,87	67,38
11,11	658,91	Fucoanthin	C42H58O6	2022	25,2	374,72	0,00	155,55	44,93	6,76

RT [min]	PM (g/mol)	Nombre	Formula molecular	AQ	mSigma	2) <i>A. c + Glucosa</i>	1) <i>D. antarctica</i>	2) <i>D. antarctica</i>	1) <i>M. pyriferu</i>	2) <i>M. pyriferu</i>
5,05	270,24	Emodin	C15H10O5	2022	1,7	2041,54	0,00	0,00	0,00	0,00
7,71	270,24	Emodin	C15H10O5	2022	13,8	820,46	1,14	2,31	2,61	2,21
10,32	416,6	8'-apo-beta,psi-caroten-8'-al	C30H40O	MANUAL	∞	78,32	0,00	0,00	2,75	0,00
11,11	658,91	Fucoanthin	C42H58O6	2022	25,2	0,00	888,23	358,66	73,66	2,27

Tabla F.4: Valores P calculados a través de prueba t de Welch, asumiendo que las desviaciones estándar no son iguales y las mediciones son independientes entre si. Lado superior derecho corresponde a comparaciones de intensidades de Apocarotenal, lado inferior izquierdo corresponde a comparaciones entre intensidades de Fucoxantina

Valores P test welch	Apocarotenal				
	<i>A. c + Glucosa</i>	<i>A. c + D. antarctica</i>	<i>A. c + M. pyrifera</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>M. pyrifera</i>
<i>A. c + Glucosa</i>	-	0,0614	0,0168	0,0477	0,0375
<i>A. c + D. antarctica</i>	0,5058	-	0,1682	0,1294	0,1243
<i>A. c + M. pyrifera</i>	0,3294	0,7239	-	0,174	0,1639
<i>D. antarctica</i>	0,2569	0,3232	0,1928	-	0,5
<i>M. pyrifera</i>	0,5092	0,5697	0,4581	0,2656	-
Fucoxantina					