



1

2

Universidad de Concepción

3

Facultad de Farmacia

4

5

6 PIGMENTOS DE *Penicillium murcianum* Y *Talaromyces australis* Y SU
7 EVALUACION COMO INGREDIENTES FUNCIONALES PARA LA
8 INDUSTRIA COSMETICA

9

10 TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS
11 FARMACEUTICAS

12

13 POR PAULINA INES CONTRERAS MACHUCA

14

Profesora Guía Dra. Marcia Avello Lorca

15

Profesores Co-Guías Dr. Marcos Fernández y Dr. Mario Aranda

16

17

Noviembre 2021

18

Concepción, Chile

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28



29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

A mi abuela y todas mis ancestras

42

43

44

AGRADECIMIENTOS

45

46 A mis profesores, a mi profesora y tía Angela, a mi familia, amigos y todas
47 las personas y seres que me apoyaron y acompañaron en este proceso.

48

49

50

51

52



53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

INDICE DE CONTENIDOS

70	INDICE DE ILUSTRACIONES	6
71	INDICE DE TABLAS	10
72	RESUMEN.....	12
73	INTRODUCCIÓN.....	16
74	PIGMENTOS DE HONGOS FILAMENTOSOS.	18
75	ANTECEDENTES DE T. AUSTRALIS Y P. MURCIANUM	25
76	EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIOXIDANTES.	31
77	ANTECEDENTES DE TOXICIDAD EN COLORANTES SINTÉTICOS.	34
78	MICROENCAPSULACIÓN PARA MEJORAR LA FORMULACIÓN.	37
79	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	53
80	METODOLOGÍAS	55
81	1. OBTENCIÓN DE MATERIA PRIMA.	55
82	2. PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS.	55
83	3. FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN CENTRIFUGA (CPC).	56
84	4. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE ALTA EFICIENCIA (HPTLC).	58
85	5. ANÁLISIS DE FRACCIONES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTO RENDIMIENTO (UHPLC) CON UN DETECTOR DE	
86	MATRIZ DE DIODOS (DAD) Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (MS Y MS-MS).	59
87	6. EVALUACIÓN DE PROPIEDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE ENSAYO CON RADICAL LIBRE DPPH.....	60
88	7. EVALUACIÓN DE PROPIEDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE ENSAYO DE CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE RADICALES DE OXÍGENO	
89	(ORAC).	61
90	8. ELABORACIÓN DE MICROCÁPSULAS POR GELACIÓN IÓNICA CON VIBRACIÓN ASISTIDA.....	62
91	9. DETERMINACIÓN DEL COLOR DE LAS MICROPARTÍCULAS DE PIGMENTOS FÚNGICOS.	65
92	10. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE LAS MICROPARTÍCULAS MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	
93	DE BARRIDO.	66
94	11. ANÁLISIS DE TAMAÑO Y DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA.....	67
95	12. MEDICIÓN DE LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.	68
96	13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	68
97	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
98	1. OBTENCIÓN DE MATERIA PRIMA.	70
99	2. PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS.	71
100	3. FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN CENTRIFUGA (CPC).	74
101	4. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE ALTO RENDIMIENTO (HPTLC).....	93
102	5. ANÁLISIS DE FRACCIONES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTO RENDIMIENTO (UHPLC) CON UN DETECTOR DE	
103	ARREGLO DE DIODOS (DAD) Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (MS Y MS-MS).	97

104	124
105	6. EVALUACIÓN DE PROPIEDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE ENSAYO CON RADICAL LIBRE DPPH.....	126
106	7. EVALUACIÓN DE PROPIEDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE ENSAYO DE CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE RADICALES DE OXÍGENO	
107	(ORAC).	153
108	8. ELABORACIÓN DE MICROCÁPSULAS POR GELACIÓN IÓNICA CON VIBRACIÓN ASISTIDA.....	162
109	9. DETERMINACIÓN DEL COLOR DE LAS MICROPARTÍCULAS DE PIGMENTOS FÚNGICOS.	170
110	10. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE LAS MICROPARTÍCULAS MEDIANTE MICROSCOPÍA ÓPTICA Y MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA	
111	DE BARRIDO.	175
112	11. ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LAS MICROPARTÍCULAS MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA.	198
113	12. MEDICIÓN DE LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.	211
114	CONCLUSIONES.....	215
115	BIBLIOGRAFÍA.....	216
116		
117		
118		
119		
120		
121		
122		
123		
124		
125		
126		
127		
128		
129		
130		
131		
132		



135	Ilustración 1 Pigmentos producidos por los géneros <i>Monascus</i> y <i>Penicillium</i> ⁵	20
136	Ilustración 2 Cultivos de <i>Talaromyces australis</i> (CBS 137102), colonias que varían de marrón a rojo	
137	(superior). Conidióforos (estructuras microscópicas responsables de la reproducción asexual) y conidios	
138	(esporas) (inferior) ¹¹	21
139	Ilustración 3 Estructuras químicas de compuestos producidos por <i>T. atroseus</i> ¹⁶	23
140	Ilustración 4 Estructura química de colorante patentado Arpink Red® obtenido a partir de <i>P. oxalicum</i> ¹⁵ .	
141	24
142	Ilustración 5 Estructuras químicas de moléculas reportadas en especies <i>P. murcianum</i> y <i>T.</i>	
143	<i>australis</i> . ^{21,24,25}	26
144	Ilustración 6 Estructura química del ácido algínico extraído de <i>Macrosystis pyrifera</i> ⁵⁴	39
145	Ilustración 7 Estructura de bloques G, M y MG del ácido algínico. ⁵⁶	40
146	Ilustración 8 Modelo de gelificación “egg-box” del alginato con el calcio ⁵⁷	41
147	Ilustración 9 Mecanismos de gelificación iónica del alginato ⁵⁶	43
148	Ilustración 10 Representación de la estructura química del quitosano ⁶²	44
149	Ilustración 11 Estructura química del ácido hialurónico ⁶³	45
150	Ilustración 12 Mecanismo de obtención de microcápsulas con encapsulador B-390 ⁶⁶	48
151	Ilustración 13 Tablas de influencia de parámetros en tamaño de micropartículas y productividad,	
152	influencia de la viscosidad y optimización de parámetros del proceso.	50
153	Ilustración 14 (A) Extractos fúngicos purificados por columna de Amberlite XAD-16; (B) Extractos secos	
154	de <i>P. murcianum</i> (café claro) y de <i>T. australis</i> (rojizo).	72
155	Ilustración 15 Prueba cualitativa para selección del sistema de fases en fraccionamiento de extracto de	
156	<i>P. murcianum</i> (PM1). AE=acetato de etilo, Bu=butanol, A=agua, H=hexano, M=metanol.....	76
157	Ilustración 16 Cromatogramas de partición centrifuga para (A) PM1; (B) PM2; (C) PM3. En azul se	
158	señalan algunas muestras de interés.	78
159	Ilustración 17 Gradillas con tubos donde se colectaron las fracciones de (A) PM1; (B) PM2; (C) PM3. 80	
160	Ilustración 18 Prueba cualitativa para selección de sistema de fases para fraccionamiento del extracto de	
161	<i>T. australis</i> (TA1). H=hexano, AE=acetato de etilo, M=metanol, A=agua, Bu=butanol.	82
162	Ilustración 19 Cromatogramas de partición centrifuga para (A) TA1; (B) TA2. En azul se señalan las	
163	muestras de interés.	84
164	Ilustración 20 Gradillas con tubos donde se colectaron las fracciones de (A) TA1; (B) TA2.	86
165	Ilustración 21 Prueba cualitativa para comparación de la distribución de los pigmentos entre dos	
166	sistemas bifásicos en fraccionamiento de muestra de <i>T. australis</i> (TA3).....	87
167	Ilustración 22 Cromatogramas de partición centrifuga para las muestras (A) TA3; (B) TA4. En azul se	
168	señalan algunas muestras de interés.	89
169	Ilustración 23 (A) Gradilla con tubos con fracciones de TA3 y algunos viales analizados; (B) Gradilla	
170	con tubos donde se colectaron fracciones de TA4 y viales seleccionados.	90
171	Ilustración 24 Placas sembradas con (A) Extracto total de <i>P. murcianum</i> ; (B) Extracto total de <i>T.</i>	
172	<i>australis</i> . FM = acetoneitrilo : agua : ácido fórmico (8,0: 1,9:0,1).	94
173	Ilustración 25 Placas sembradas con muestras (A) <i>P. murcianum</i> (pigmentos amarillos); (B) <i>T. australis</i>	
174	(pigmentos rojos). FM (2) = 2-butanol : acetato de etilo : ácido fórmico (4,0:0,9:0,1); FM (3) =	
175	acetoneitrilo : agua : ácido fórmico (8,0:1,9:0,1).	95

176	Ilustración 26 Placas de izq. a der. con luz visible, fluorescente y ultravioleta; (A) Muestra 3 y (B)	
177	Muestra 5 de <i>P. murcianum</i> ; (C) Muestra 2 y (D) Muestra 5 de <i>T. australis</i> . FM (1)= H: AE: AF	
178	(24:18:1); FM (3)= ACN: A: AF (8,0:1,9 :0,1).....	96
179	Ilustración 27 (A) Cromatograma UHPLC; (B) Espectrograma de 200-600 nm para la señal principal	
180	registrada en un $t_R = 7,617$ min en la muestra 3 de <i>P. murcianum</i>	100
181	Ilustración 28 Espectro de masas y estructura química de compuesto principal en la muestra 3 de <i>P.</i>	
182	<i>murcianum</i>	101
183	Ilustración 29 Cromatograma en tándem MS-MS para el m/z 421,15.....	104
184	Ilustración 30 Espectro de masa-masa para el ión molecular 421,15 en la muestra 3 de <i>P. murcianum</i> .	
185	104
186	Ilustración 31 Fragmentos obtenidos desde monascin a través de ChemDraw®, para los valores m/z	
187	obtenidos en el análisis ESI (-) /MS-MS en la muestra 3 de <i>P. murcianum</i>	105
188	Ilustración 32 (A) Cromatograma UHPLC; (B) Espectrograma UV-VIS desde 200 a 800 nm para	
189	muestra 5 de <i>P. murcianum</i>	107
190	Ilustración 33 Espectro de masas modo scan y estructura química del pigmento mayoritario propuesto	
191	para la muestra 5 de <i>P. murcianum</i>	108
192	Ilustración 34 Cromatograma en tándem MS-MS para el m/z 319,10.....	109
193	Ilustración 35 Espectros de tándem MS-MS para el ión molecular 319,10 en muestra 5 de <i>P. murcianum</i> .	
194	109
195	Ilustración 36 Fragmentos de monashexenona obtenidos través de software Chemdraw® para explicar el	
196	resultado del tándem MS-MS.....	110
197	Ilustración 37 (A) Cromatograma obtenido por HPLC; (B) Espectrograma UV-VIS desde 200-800 nm,	
198	para la muestra 2 de <i>T. australis</i>	114
199	Ilustración 38 Espectros de masas modo scan a (A) $t_{R1} = 14,38$ min; (B) $t_{R2} = 16,90$ min y compuestos	
200	propuestos para la muestra 2 de <i>T. australis</i>	115
201	Ilustración 39. Cromatograma en tándem MS-MS para el m/z 548,20.....	117
202	Ilustración 40 Espectros en tándem MS-MS para el m/z 548,20 para muestra 2 de <i>T. australis</i>	118
203	Ilustración 41 Fragmentos de atrorosin H obtenidos por software Chemdraw® para explicar el resultado	
204	del tándem MS-MS.....	119
205	Ilustración 42 (A) Cromatograma obtenido por HPLC; (B) Espectrograma UV-VIS de 200-800 nm, para	
206	muestra 31 de <i>T. australis</i>	121
207	Ilustración 43 Espectro de masas con un $t_R = 9,95$ min en muestra 31 de <i>T. australis</i>	122
208	Ilustración 44 Cromatograma en tándem MS-MS para el m/z 281,05 para muestra 31 de <i>T. australis</i>	123
209	Ilustración 45 Espectros de masa-masa para el ión molecular 281,05 para la muestra 31 de <i>T. australis</i> .	
210	123
211	Ilustración 46 Fragmentos tentativos de damnacanthal obtenidos de manera teórica a través de software	
212	Chemdraw®.....	124
213	Ilustración 47 Microplaca de 96 pocillos con muestras de pigmentos fúngicos analizados a través de la	
214	eliminación del radical libre DPPH.....	127
215	Ilustración 48 Ecuación de la recta para obtención de IC_{50} del extracto total de <i>P. murcianum</i>	131
216	Ilustración 49 Ecuación de la recta para obtención de IC_{50} de la muestra 3 de <i>P. murcianum</i>	133
217	Ilustración 50 Ecuación de la recta para obtención de IC_{50} de la muestra 5 de <i>P. murcianum</i>	135
218	Ilustración 51 Ecuación de la recta para obtención de IC_{50} de la muestra 14 de <i>P. murcianum</i>	137
219	Ilustración 52 Cinética de inhibición del radical DPPH por el extracto total de <i>P. murcianum</i> durante 90	
220	minutos.....	138
221	Ilustración 53 Ecuación de la recta para obtención de IC_{50} del extracto total de <i>T. australis</i>	143
222	Ilustración 54 Ecuación de la recta para obtención de IC_{50} de la muestra 20 de <i>T. australis</i>	145

223	Ilustración 55 Ecuación de la recta para obtención de IC_{50} de la muestra 35 de <i>T. australis</i>	147
224	Ilustración 56 Ecuación de la recta para obtención de IC_{50} de la muestra 36 de <i>T. australis</i>	149
225	Ilustración 57 Cinética de inhibición del radical DPPH por el extracto total de <i>T. australis</i> durante 90	
226	minutos.....	150
227	Ilustración 58 Curva para determinar los equivalentes trolox de las muestras evaluadas en ensayo	
228	DPPH.....	151
229	Ilustración 59 Lecturas de fluorescencia relativa en el tiempo para las muestras de <i>P. murcianum</i>	155
230	Ilustración 60 Lecturas de fluorescencia relativa en el tiempo para las muestras de <i>T. australis</i>	156
231	Ilustración 61 Lecturas de fluorescencia relativa en el tiempo para distintas concentraciones de trolox.	
232	157
233	Ilustración 62 Estructura química reactivo trolox.	159
234	Ilustración 63 Encapsulador B-390 BÜCHI con la botella de presión que contiene la solución de alginato	
235	de sodio al 1,5%y el baño iónico con la solución de cloruro de calcio 0,2 M.	164
236	Ilustración 64 Chorro uniformemente aspersado en microencapsulador B-390.....	166
237	Ilustración 65 Polvos de microencapsulados obtenidos para <i>P. murcianum</i>	167
238	Ilustración 66 Polvos de microencapsulados obtenidos para <i>T. australis</i>	168
239	Ilustración 67 Polvos de microencapsulados que fueron evaluados por colorimetría.	174
240	Ilustración 68 Micropartículas obtenidas directamente del baño iónico en el proceso de	
241	microencapsulación.....	176
242	Ilustración 69 Aglomerados de microcápsulas secadas a temperatura ambiente en desecador al vacío.	177
243	Ilustración 70 Polvo de microcápsulas secadas por liofilización.	178
244	Ilustración 71 Microfotografía por SEM de microcápsulas sin pigmentos.	178
245	Ilustración 72 Micropartículas rehidratadas obtenidas por el proceso de gelación iónica con vibración	
246	asistida por encapsulador.	179
247	Ilustración 73 Microfotografías en microscopio electrónico de barrido para micropartículas liofilizadas.	
248	180
249	Ilustración 74 Polvo seco de microencapsulados de los lotes (A) PM4a; (B) TA4a.....	181
250	Ilustración 75 Microfotografías en microscopio electrónico de barrido para micropartículas liofilizadas	
251	de los lotes (A) PM4a; (B) TA4a.	182
252	Ilustración 76 Microfotografía en microscopio electrónico de barrido para micropartículas liofilizadas	
253	de <i>T. australis</i> (TA4a).	183
254	Ilustración 77 Microfotografías de micropartículas híbridas de alginato y ácido hialurónico, (A)= 1%	
255	Alg : 0,07% AH; (B)= 1,3% Alg : 0,07% AH; (C)= 1,3% Alg : 0,035% AH.....	184
256	Ilustración 78 Polvos liofilizados de microencapsulados de los lotes PM4a y PM4b; (B) TA4a y TA4b.	185
257	Ilustración 79 Polvos liofilizados de microencapsulados de los lotes (A) PM4c; PM4d y (B) TA4c y TA4d.	
258	186
259	Ilustración 80 Esquema de formación de micropartículas de alginato/ácido hialurónico/quitosano ⁷¹	187
260	Ilustración 81 Polvos liofilizados de microencapsulados de los lotes (A) PM4e; PM5a; PM5b; (B) PM5c;	
261	PM5d; (C) TA4e; TA5a; TA5b.	188
262	Ilustración 82 Microfotografía en microscopio óptico con aumento 4X para muestra liofilizada de <i>P.</i>	
263	<i>murcianum</i> (PM4e).....	189
264	Ilustración 83 Microfotografía en microscopio electrónico de barrido para muestra liofilizada de <i>P.</i>	
265	<i>murcianum</i> (PM4e).....	190
266	Ilustración 84 Microfotografía en microscopio óptico con aumento 4X para muestra liofilizada de <i>T.</i>	
267	<i>australis</i> (TA4e).	191
268	Ilustración 85 Microfotografía en microscopio electrónico de barrido para muestra liofilizada de <i>T.</i>	
269	<i>australis</i> (TA4e).....	192

270	Ilustración 86 Microfotografía en microscopio óptico con aumento 4X para muestra liofilizada de <i>P.</i>	
271	<i>murcianum</i> (lote PM5c).	193
272	Ilustración 87 Microfotografía en microscopio electrónico de barrido para muestra liofilizada de <i>P.</i>	
273	<i>murcianum</i> (lote PM5c).	194
274	Ilustración 88 Microfotografía en microscopio óptico con aumento 4X para muestra liofilizada de <i>T.</i>	
275	<i>australis</i> (lote TA5b).	195
276	Ilustración 89 Microfotografía en microscopio electrónico de barrido para muestra liofilizada de <i>T.</i>	
277	<i>australis</i> (lote TA5b).	196
278	Ilustración 90 Histograma de Frecuencias de tamaños de las micropartículas de <i>P. murcianum</i> (lote	
279	PM4e).	200
280	Ilustración 91 Gráfico de probabilidad para log de diámetro medio y frecuencia porcentual acumulada	
281	en las micropartículas de <i>P. murcianum</i> (PM4e).	200
282	Ilustración 92 Histograma de frecuencias de tamaños de las micropartículas de <i>T. australis</i> (TA4e). ...	203
283	Ilustración 93 Gráfico de probabilidad para log de diámetro medio y frecuencia porcentual acumulada	
284	de las micropartículas de <i>T. australis</i> (lote TA4e).	203
285	Ilustración 94 Histograma de Frecuencias de tamaños de micropartículas de <i>P. murcianum</i> (lote PM5c).	
286	206
287	Ilustración 95 Gráfico de probabilidad para log de diámetro medio versus frecuencia porcentual	
288	acumulada en las micropartículas de <i>P. murcianum</i> (lote PM5c).	206
289	Ilustración 96 Histograma de frecuencias de tamaños de las micropartículas de <i>T. australis</i> (TA5b). ...	209
290	Ilustración 97 Gráfico de probabilidad para log de diámetro medio y frecuencia porcentual acumulada	
291	en las micropartículas de <i>T. australis</i> (lote TA5b).	209
292	Ilustración 98 Proceso de extracción de pigmentos y determinación de eficiencia de encapsulación.	212
293		
294		
295		
296		
297		
298		
299		
300		
301		
302		

303

304

INDICE DE TABLAS

305

306	Tabla 1 Pigmentos identificados en especies de <i>Penicillium</i> y <i>Talaromyces</i>	23
307	Tabla 2 Antecedentes de las especies <i>P. murcianum</i> y <i>T. australis</i>	25
308	Tabla 3 Físicoquímica y toxicidad de posibles pigmentos en los extractos de <i>P. murcianum</i> y <i>T.</i>	
309	<i>australis</i> ³⁰	29
310	Tabla 4 Cantidad utilizada para cada uno de los componentes necesarios en la formación de	
311	microcápsulas obtenidas por gelación iónica.....	64
312	Tabla 5 Parámetros ajustados en el equipo, que fueron utilizados para cada lote en la elaboración de las	
313	micropartículas.	65
314	Tabla 6 Muestras utilizadas en la presente investigación, los medios de cultivos utilizados y los volúmenes	
315	entregados.	71
316	Tabla 7 Muestras, extractos y rendimientos obtenidos al purificar con amberlite XAD-16.....	73
317	Tabla 8 Condiciones obtenidas para las separaciones de las muestras PM1, PM2 y PM3 en equipo de	
318	contracorriente.	77
319	Tabla 9 Fracciones para análisis químico obtenidas en la separación de las muestras de PM1 y PM2....	81
320	Tabla 10 Condiciones obtenidas para las separaciones de las muestras TA1 y TA2.....	83
321	Tabla 11 Información obtenida de la CPC para las muestras TA3 y TA4.....	88
322	Tabla 12 Fracciones obtenidas en la separación de las muestras de TA1, TA2 y TA3.	91
323	Tabla 13 Datos obtenidos a partir de los espectros de masa en modo scan para las muestras de <i>P.</i>	
324	<i>murcianum</i>	98
325	Tabla 14 Valores de masa teóricos y experimentales para fragmentos obtenidos por ESI-MS-MS para el	
326	ión molecular 421,15 en la muestra 3 de <i>P. murcianum</i>	106
327	Tabla 15 Valores de masa propuestos y valores experimentales obtenidos por tándem MS-MS para ión	
328	molecular 319,10 en muestra 5 de <i>P. murcianum</i>	111
329	Tabla 16 Datos obtenidos a partir de los espectros de masa para las muestras de <i>T. australis</i>	113
330	Tabla 17 Comparación de fragmentos obtenidos del ión molecular 548,20 por análisis MS-MS y de	
331	fragmentos propuestos de manera teórica.....	120
332	Tabla 18 Valores de m/z de fragmentos obtenidos por tándem MS-MS y de fragmentos obtenidos de	
333	manera teórica a partir de ChemDraw®.	125
334	Tabla 19 Valores de inhibición del radical DPPH para extractos y fracciones de <i>P. murcianum</i> . Las	
335	absorbancias son promedios $\pm SD$ n =3.....	128
336	Tabla 20 Concentraciones del extracto total de <i>P. murcianum</i> y sus respectivos valores de inhibición de	
337	DPPH. Las absorbancias son promedios $\pm SD$ n =3.....	130
338	Tabla 21 Inhibición de DPPH a distintas concentraciones para la muestra 3 de <i>P. murcianum</i> . Las	
339	absorbancias son promedios $\pm SD$ n =3.....	132
340	Tabla 22 Inhibición de DPPH a distintas concentraciones para la muestra 5 de <i>P. murcianum</i> . Las	
341	absorbancias son promedios $\pm SD$ n =3.....	134
342	Tabla 23 Distintas concentraciones de la muestra 14 de <i>P. murcianum</i> para obtener IC ₅₀ . Las	
343	absorbancias son promedios $\pm SD$ n =3.....	136
344	Tabla 24 Inhibición del 50% de radical libre DPPH (IC ₅₀) para muestras de <i>P. murcianum</i>	138
345	Tabla 25 Valores de inhibición del radical DPPH para extractos y fracciones de <i>T. australis</i> . Las	
346	absorbancias son promedios $\pm SD$ n =3.....	139

347	Tabla 26 Distintas concentraciones del extracto total de <i>T. australis</i> para obtener IC_{50} . Las absorbancias son promedios $\pm SD$ $n = 3$	142
348		
349	Tabla 27 Concentraciones de la muestra 20 de <i>T. australis</i> para inhibir DPPH. Las absorbancias son promedios $\pm SD$ $n = 3$	144
350		
351	Tabla 28 Concentraciones de la muestra 35 de <i>T. australis</i> para inhibir DPPH. Las absorbancias son promedios $\pm SD$ $n = 3$	146
352		
353	Tabla 29 Concentraciones de la muestra 36 de <i>T. australis</i> para inhibir DPPH. Las absorbancias son promedios $\pm SD$ $n = 3$	148
354		
355	Tabla 30 Concentraciones para la inhibición del 50% de radical libre DPPH (IC_{50}) para extractos y fracciones de <i>T. australis</i>	150
356		
357	Tabla 31 Valores obtenidos del ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).	154
358	Tabla 32 Parámetros iniciales ajustados en el microencapsulador.	163
359	Tabla 33 Rendimientos obtenidos en cada lote de microencapsulados.	169
360	Tabla 34 Determinación de color a través de la obtención de los factores CIE $L^*a^*b^*$	171
361	Tabla 35. Diferencias de color entre muestras y lotes.	172
362	Tabla 36 Distribución de frecuencias de tamaños de micropartículas de <i>P. murcianum</i> (lote PM4e).	199
363	Tabla 37 Diámetros geométricos y estadísticos para las micropartículas de <i>P. murcianum</i> (lote PM4e).	201
364		
365	Tabla 38 Distribución de frecuencias de los tamaños de las micropartículas de <i>T. australis</i> (TA4e).	202
366	Tabla 39 Diámetros geométricos y estadísticos para las micropartículas de <i>T. australis</i> (lote TA4e).	204
367	Tabla 40 Distribución de frecuencias de los tamaños de las micropartículas de <i>P. murcianum</i> (lote PM5c).	205
368		
369	Tabla 41. Diámetros geométricos y estadísticos para las micropartículas de <i>P. murcianum</i> (lote PM5c).	207
370		
371	Tabla 42 Distribución de frecuencias de los tamaños de las micropartículas de <i>T. australis</i> (lote TA5b).	208
372		
373	Tabla 43 Diámetros geométricos y estadísticos para las micropartículas de <i>T. australis</i> (lote TA5b).	210
374	Tabla 44 Porcentaje de eficiencia de encapsulación para los distintos lotes de pigmentos de <i>P. murcianum</i>	213
375		
376		
377		
378		
379		
380		
381		
382		
383		
384		

385

386

RESUMEN

387

388 Debido a los problemas de toxicidad producidos por ingredientes de origen
389 sintético usados comúnmente en la industria cosmética, se hace necesario
390 encontrar nuevas fuentes sostenibles y alternativas de metabolitos
391 secundarios, como ingredientes más seguros para la población y los
392 ecosistemas. De esta forma surge la idea de investigar los pigmentos
393 extracelulares producidos por hongos filamentosos de los bosques nativos de
394 Chile, los cuales no han sido previamente caracterizados. Para ello, se
395 utilizaron cultivos fúngicos con un alto contenido de pigmentos. En
396 promedio, se extrajeron 3 mg/mL de pigmentos amarillos y marrones en
397 *Penicillium murcianum* y 5 mg/mL de pigmentos rojos y amarillos para
398 *Talaromyces australis*. Los extractos brutos fueron fraccionados por
399 cromatografía de partición centrífuga (CPC), y posteriormente,
400 caracterizados por cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC)
401 con un detector de arreglo de diodos y espectrometría de masas en modo scan
402 y tándem MS-MS. Los resultados revelaron la presencia de azafilonas como
403 monascin ($m/z=411,15$) y monashexenone ($m/z=319,10$) para *P. murcianum*.

404 En el caso de *T. australis*, se detectó la presencia mayoritaria de la azafilona
405 athrorosin H ($m/z=458,20$) y del hidroxiantraquinoide damnacantal
406 ($m/z=281,05$). En las fracciones obtenidas a partir de cultivos fúngicos, fue
407 posible detectar una propiedad antioxidante cercana al 80% en varias de las
408 muestras analizadas mediante el radical DPPH. Se registró un valor de IC_{50}
409 de 4,63 mg/mL para el extracto total de *P. murcianum* y de 3,40 mg/mL para
410 el extracto total de *T. australis*. En el caso de las fracciones purificadas,
411 destaca una muestra (n°5) de *P. murcianum* con un IC_{50} de 1,83 mg/mL y una
412 muestra (n°36) para *T. australis* con un IC_{50} de 1,36 mg/mL. Además, fue
413 posible detectar propiedad antioxidante significativa en el ensayo de la
414 capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). En este ensayo
415 destacó particularmente una fracción de *P. murcianum* que alcanzó un valor
416 superior a 2130 μmol de equivalentes trolox por gramo de muestra, que
417 podría atribuirse a la presencia de los compuestos mencionados
418 anteriormente. Mediante microencapsulación por gelación iónica con
419 vibración asistida, se obtuvieron microcápsulas híbridas de alginato de sodio
420 1,3%, quitosano 0,2% y ácido hialurónico 0,07% cargadas con los pigmentos
421 de *T. australis* y *P. murcianum*. Al caracterizar la forma de las microcápsulas
422 por microscopía óptica (OM) y electrónica de barrido (SEM), se determinó

423 una forma irregular de cubo o esfera y un tamaño de partícula clasificado
424 como intermedio para procesos farmacéuticos (75-1000 μm). Al realizar el
425 análisis de distribución de tamaño por OM, para *P. murcianum* se seleccionó
426 el lote PM5c cuyos diámetros estadísticos son: DAV=545,48, DVS= 647,43,
427 DS= 569,37 y DV=594,28 μm . Para *T. australis*, el lote seleccionado fue
428 TA5b cuyos diámetros estadísticos son: DAV=338,06, DVS= 427,27, DS=
429 358,45 y DV=380,06 μm . A través del análisis colorimétrico se determinaron
430 las coordenadas CIE L*a*b*, estableciendo el color para cada lote. En este
431 caso las coordenadas para algunos de los lotes destacados son: PM5d
432 (L=65,565, a=3,066, b=12,200) y TA5a (L=57,403, a=13,093, b=8,095). Las
433 microcápsulas obtenidas logran una aceptable eficiencia de encapsulación,
434 de 32,9% y 28,4% para los lotes seleccionados de *P. murcianum* PM4e y
435 PM5d, respectivamente. Los lotes de *T. australis* presentan una mayor
436 eficiencia de encapsulación, destacando TA4e con un 40,4% y TA5a con un
437 41,5%. Estos resultados demuestran el potencial biotecnológico de las
438 especies fúngicas *P. murcianum* y *T. australis* para obtener pigmentos con
439 actividad antioxidante que podrían ser útiles como ingredientes funcionales
440 más seguros para la industria cosmética. De esta forma se avanza en la
441 caracterización química de los pigmentos de especies fúngicas locales,

442 contribuyendo al desarrollo de nuevas fuentes de metabolitos secundarios y
443 nuevas líneas de investigación en el área.

444

445

446

447

448



449

450

451

452

453

454

455

456

INTRODUCCIÓN

457

458

459 La sociedad actual cada día demanda productos con compuestos químicos
460 novedosos, con menor contenido de aditivos y sustancias químicas sintéticas
461 que puedan generar toxicidad. Esto debido a los distintos riesgos que se
462 puedan presentar, ya sea en la investigación y desarrollo, como en la
463 distribución del producto en la población. De esta forma, se han ido
464 implementado mayores reglamentaciones ambientales en algunos países,
465 donde han prohibido o limitado el uso de muchos compuestos químicos
466 sintéticos¹. Junto a esto, se está incentivando la búsqueda de nuevas
467 moléculas, preferentemente de origen natural y tecnologías más sustentables
468 con el ambiente y con quien las manipule²³. En este marco, se presentan los
469 postulados de la “*química verde*”, una tendencia mundial basada en la
470 sostenibilidad, con desarrollo de métodos y procesos que eviten o minimicen
471 la generación de impactos ambientales⁴. En el caso de la química de los
472 productos naturales, el diseño de métodos de extracción ecológicos y
473 sostenibles de productos naturales está actualmente en creciente
474 investigación. Los estudios desarrollados sistematizan las directrices que se
475 deben tener para estar dentro de esta categoría de “ciencia verde”. A partir de

476 esto, Chemat *et al* 2012², define algunos principios que deben ser
477 considerados al seleccionar un método:

- 478 • Principio 1: Innovar mediante la selección de variedades y el uso de
479 recursos naturales renovables.
- 480 • Principio 2: Reducir o eliminar la utilización de solventes o en su
481 defecto usar solventes alternativos y agua de manera sustentable.
- 482 • Principio 3: Reducir el consumo de energía mediante la recuperación
483 de energía y el uso de tecnologías innovadoras.
- 484 • Principio 4: Generar co-productos en lugar de desechos, para incluir la
485 bio-refinación agro-industrial.
- 486 • Principio 5: Reducir el número de operaciones y favorecer los procesos
487 seguros, robustos y controlados.
- 488 • Principio 6: Obtener un extracto no desnaturalizado y biodegradable,
489 sin contaminantes².

490 La presente investigación se basará en los principios 1 y 6, debido a que se
491 utilizará un método sustentable de obtención de extractos naturales a partir
492 de microorganismos cultivados en laboratorio⁵⁶. Con este método se podrán
493 obtener extractos o fracciones activas en cualquier época, sin agotamiento del
494 recurso natural y bajo condiciones estandarizadas de producción. Por lo tanto,

495 existe un enorme potencial para el desarrollo de sistemas robustos de
496 producción de metabolitos de interés comercial, como pigmentos producidos
497 por microorganismos, tanto para mejorar la funcionalidad como para
498 expandir la paleta de colores de los colorantes naturales contemporáneos⁷.

499

500 **Pigmentos de hongos filamentosos.**

501 La aprobación de los carotenoides fúngicos como colorantes alimentarios por
502 parte de la Unión Europea ha reforzado las perspectivas de las fábricas o
503 factorías de células fúngicas para la producción de pigmentos policétidos⁷.

504 Los microorganismos productores de pigmentos tienen un potencial
505 prometedor para enfrentar los desafíos actuales. Además, los colores
506 naturales no solo mejoran la comercialización del producto, sino que también
507 agregan características adicionales, como propiedades antioxidantes, contra
508 el cáncer, entre otros⁵. Dentro de la investigación sobre nuevas fuentes de
509 metabolitos activos de utilidad farmacéutica existe un creciente interés por
510 los productos forestales no madereros (PFNM). En este caso, el Reino Fungi,
511 es un interesante grupo a investigar, porque son productores de un gran
512 número de metabolitos que, debido a su diversidad estructural, presentan
513 interés químico y un gran potencial en cuanto a actividad biológica. El

514 sistema fúngico tiene una constitución genética compleja y exhibe una gran
515 variabilidad morfológica, intra e inter-específica, la cual es influenciada
516 considerablemente por factores ambientales⁸. Otro punto interesante es que
517 debido a los avances de la biotecnología se han desarrollado métodos para
518 cultivo *in vitro* a través de reactores que asimilan las condiciones óptimas
519 para su desarrollo⁶. De esta forma se otorga un mayor valor a estos
520 organismos y se fomenta la importancia de la protección de la biodiversidad
521 en los ecosistemas. Los hongos filamentosos tienen importantes propiedades
522 que han sido explotadas durante años en la producción de alimentos y
523 productos medicinales. Su potencial bioquímico y su fácil adaptación a
524 condiciones de crecimiento en medios líquidos de composición sencilla,
525 hacen que se explote industrialmente la producción de moléculas de diversa
526 naturaleza, por estos microorganismos⁹. Existen varios pigmentos fúngicos
527 implicados en la producción industrial, como los pigmentos del género
528 *Monascus*. Estos microorganismos producen pigmentos amarillos llamados
529 monascin, sequoiamonascin C y ankaflavin, naranjas como monascorubín y
530 rubropuctatín y rojos como monascorubramina y rubropuctamina⁵. Algunos
531 de estos pigmentos y su coloración se observan en la Ilustración 1.

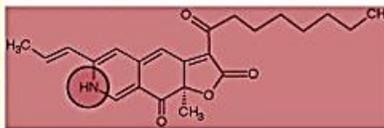
532

533



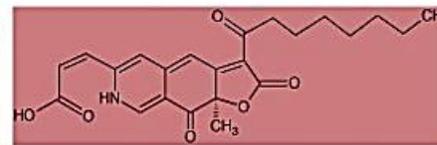
Monascorubrin (orange); *Monascus* and *Penicillium* species

534



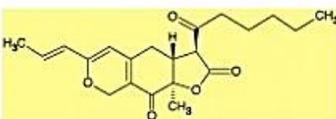
Monascorubramine (purple-red); *Monascus* and *Penicillium* species

535



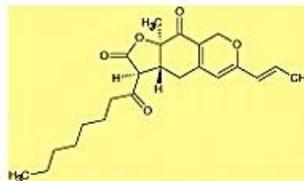
12-Carboxyl-monascorubramine or PP-V (purple-red); *Monascus* and *Penicillium* species

536



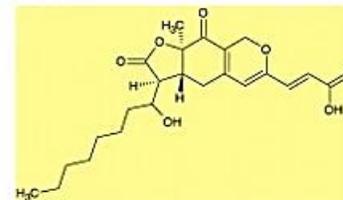
Monascin (yellow); *Monascus* and *Penicillium* species

537



Ankellavin (yellow); *Monascus* and *Penicillium* species

538



Sequolamonascin C (yellow); *Monascus* and *Penicillium* species

539

Ilustración 1 Pigmentos producidos por los géneros *Monascus* y *Penicillium*⁵.

540

541

542



543

En la literatura, como se mencionaba anteriormente, además del género

544

Monascus, se describen ampliamente los géneros *Penicillium* y *Talaromyces*,

545

que producen azafilonas como N-glutarylmonascorubramina, N-glutaryl-

546

rubropunctamina, PP-V [(10 Z)] - 12-carboxyl-monascorubramina] y PP-R

547

[(10 Z) -7- (2-hydroxy) -monascorubramina]¹⁰. Los colores más comunes

548

producidos por estos géneros incluyen amarillo, rojo, naranja y marrón

549

rojizo. Sin embargo, se encontró que los pigmentos amarillos parecen

550

predominantes en la mayoría de las especies de *Penicillium*. Por otro lado,

551

las especies de *Talaromyces* producen principalmente pigmentos rojos y en

552 menor cantidad pigmentos anaranjados y amarillos, como se observa en la
553 Ilustración 2.

554

555

556

557

558

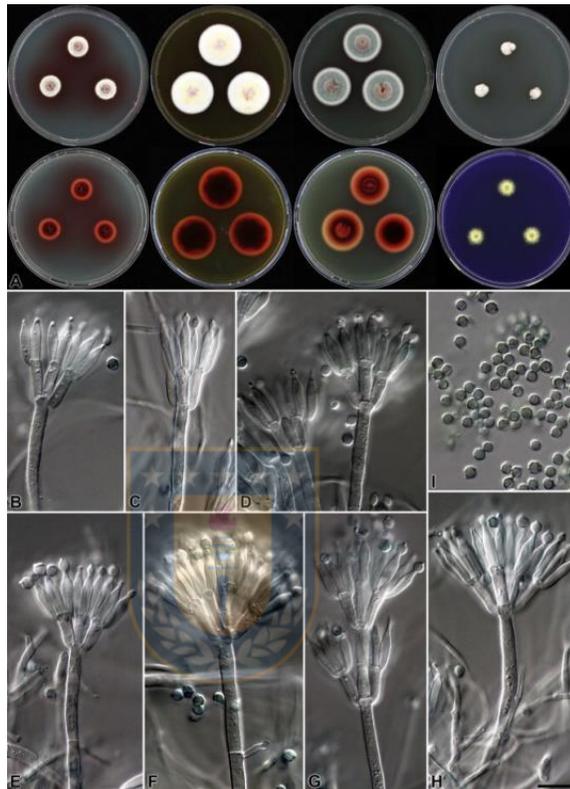
559

560

561

562

563



564 *Ilustración 2* Cultivos de *Talaromyces australis* (CBS 137102), colonias que
565 varían de marrón a rojo (superior). Conidióforos (estructuras microscópicas
566 responsables de la reproducción asexual) y conidios (esporas) (inferior)¹¹.

567

568 Una característica interesante que se debe tener en cuenta en una aplicación
569 industrial, es que a través de la manipulación genética de los
570 microorganismos se puede modular la producción de los pigmentos de

571 interés. Un ejemplo es *Trichoderma reesei* ZC121, donde la cepa *T. reesei*
572 RUT-C30 mediante mutagénesis, exhibió una hiperproducción constitutiva
573 de sorbicilinoïdes en todas las condiciones de cultivo probadas¹². De esta
574 forma, se realiza un mejoramiento biotecnológico que podría ser útil para la
575 producción industrial de compuestos químicos que presentan bajos
576 rendimientos. Otra especie de interés es *Talaromyces thermophilus*, el cual
577 produce una clase de metabolitos híbridos PKS-NRPS, que poseen una
578 macrolactona portadora de lactama de 13 miembros, termólidos A–F (1–6).
579 Estos han demostrado una potente actividad nematocida, comparable a las
580 avermectinas comerciales¹³. Otro ejemplo es *Talaromyces flavus*, desde
581 donde se han aislado metabolitos como vermiculine, vermistatin,
582 dehydrolatenusin, o purpactins, con utilidad en inmunología, tratamientos del
583 cáncer o enfermedades metabólicas¹⁴. Los principales grupos químicos de
584 pigmentos encontrados en especies de los géneros *Penicillium* y
585 *Talaromyces*, se describen en la Tabla 1.

586

587

588

589

590 *Tabla 1 Pigmentos identificados en especies de Penicillium y Talaromyces.*

Especie	Molécula	Color	Actividad Biológica
<i>P. oxalicum</i>	Arpink Red® (antraquinona)	Rojo	Bacteriostática, fungicida, antiviral, herbicida, insecticida, antitumoral, antibiótica ¹⁵
<i>P. purpurogenum</i>	PP-V [(10 Z)-12- carboxil- monascorubramina] (azafilona)	violeta	Antimicrobiana, citotóxica, antiviral, antiinflamatoria ¹⁵
<i>T. atroroseus</i>	mitorubrin, atrososin (azafilonas)	Rojo	Antimicrobiana, citotóxica, antiviral, antiinflamatoria ¹⁵
<i>P. notatum</i>	sorbicilina (sorbicilinoide)	Amarillo	Anticancerígenas, antioxidantes, antivirales y antimicrobianas ¹²

591

592 Algunas estructuras químicas de compuestos producidos por *T. atroroseus* se
593 detallan en la Ilustración 3¹⁶.

594

595

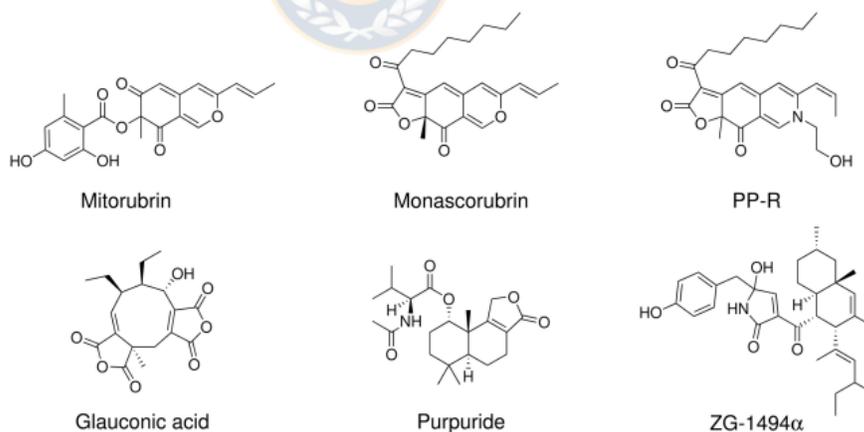
596

597

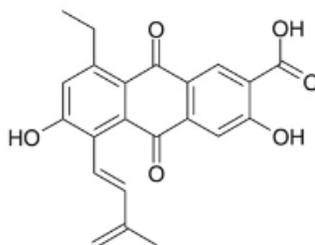
598

599

600 *Ilustración 3 Estructuras químicas de compuestos producidos por T.*
601 *atroroseus*¹⁶.



602 Un ejemplo de pigmentos fúngicos de aplicación en la industria, son los
603 pigmentos antraquinoides rojos (Arpink Red®, Natural Red®) producidos
604 por *Penicillium oxalicum* var. *armeniac*, cuya estructura se detalla en la
605 Ilustración 4¹⁵.



606
607
608
609 **Ilustración 4** Estructura química de colorante patentado Arpink Red®
610 obtenido a partir de *P. oxalicum*¹⁵.

611
612 Arpink Red® es utilizado como colorante de productos cárnicos, bebidas
613 alcohólicas y no alcohólicas, productos lácteos, helados y confites^{10,15}. En
614 esta misma línea los pigmentos de la especie *Monascus purpureus* se utilizan
615 para colorear arroz, vino, queso, pescado y carnes principalmente. En ambos
616 casos, el uso de estos colorantes está permitido en países como China,
617 Taiwán, Japón e Indonesia¹⁷.

618

619 **Antecedentes de *T. australis* y *P. murcianum***

620 La producción de pigmentos por las especies *T. australis* y *P. murcianum*,
 621 viene siendo investigada hace algún tiempo en nuestro país (FONDEF
 622 IDeA), con resultados promisorios en la tinción de telas de lana y lino, bajo
 623 condiciones utilizadas en la industria textil^{18,19}. Al realizar una búsqueda
 624 bibliográfica de algunos compuestos químicos descritos en estas especies, se
 625 encuentran algunos reportes, los que fueron agrupados en la Tabla 2, donde
 626 además se analizan los coeficientes de partición (Log P) de algunas de éstas
 627 moléculas.



628

629 **Tabla 2** Antecedentes de las especies *P. murcianum* y *T. australis*.

Especie	Molécula	Log P
<i>P. murcianum</i>	Griseofulvin, ácido penicillico ²⁰	Griseofulvina: 2,2 ²¹ Ácido penicillico: 0,9 ²²
<i>T. australis</i>	Sequoiamonascina C xantomonascina A, alenusina, alternariol, monometiléter de alternariol, hipomiltina, mitorubrina, ácido mitorubrínico, mitorubrinol, monascorubrina, rubiginosina A, rubropunctatina ¹¹	Monascorubrin: 4,3 ²³ Mitorubrin: 3,2 ²⁴

630

631 Al analizar algunos valores de log P para pigmentos puros, se observa que
 632 son mayoritariamente poco solubles en agua. Esto podría ser una ventaja, al

633 permitir una mayor estabilidad de los pigmentos en medio acuoso. Sin
634 embargo, como los extractos brutos son una mezcla de compuestos las
635 características de solubilidad pueden variar.

636 Según antecedentes bibliográficos algunas de las estructuras químicas
637 presentes en las especies *T. australis* y *P. murcianum*, pueden corresponder
638 a las que se señalan en la Ilustración 5^{21,24,25}.

639

640

641

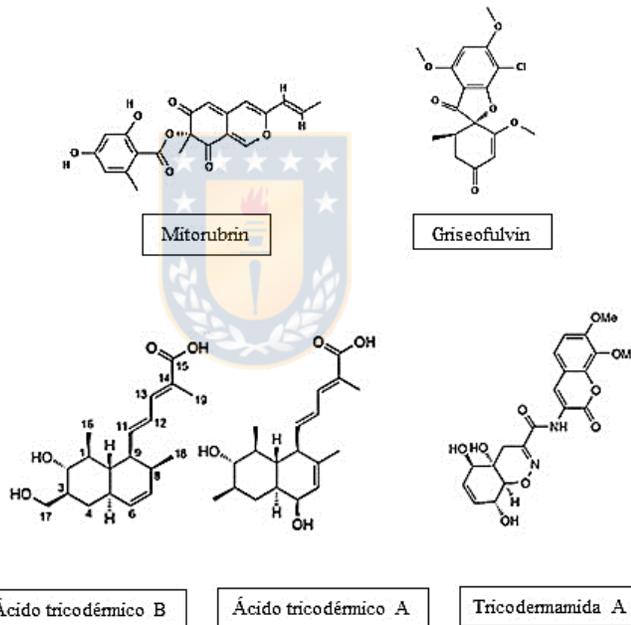
642

643

644

645

646



647 **Ilustración 5** Estructuras químicas de moléculas reportadas en especies *P.*

648 *murcianum* y *T. australis*.^{21,24,25}

649

650 Estos antecedentes demuestran la gran potencialidad de los pigmentos

651 fúngicos, los cuales podrían ser catalogados como “aditivos especializados”.

652 Lo que es definido por FIA (Fundación para la Innovación Agraria) como un
653 ingrediente o aditivo que posee la capacidad de agregar un beneficio
654 particular al producto final²⁶. Por lo que, en este caso, se tiene un producto
655 que cumpliría con la función de colorante, pero además entregaría otro
656 atributo como la propiedad antioxidante.

657

658 **Estabilidad y toxicidad en pigmentos fúngicos**

659 La degradación del color es común en los pigmentos naturales y, por lo tanto,
660 es una preocupación importante si se quieren utilizar como colorantes
661 cosméticos. Existen antecedentes de una gran estabilidad en pigmentos
662 fúngicos de las especies del género *Monascus* en condiciones de pH cercanos
663 al neutro y temperaturas inferiores a 60°C²⁷. Con respecto a las especies *T.*
664 *australis* y *P. murcianum* existe evidencia de la estabilidad de sus pigmentos,
665 al utilizarlos en la tinción de textiles^{19,28}. Pero al igual que los colorantes
666 sintéticos, los pigmentos de hongos no están libres de problemas de
667 seguridad, se han reportado casos de especies toxicogénicas que demuestran
668 actividades micotóxicas²⁷. También existen antecedentes que las cepas de
669 *Monascus* producen micotoxinas, como citrinina, una sustancia nefrotóxica
670 que también presenta propiedades antibióticas^{27,29}. Por este motivo, muchas

671 investigaciones se orientan en buscar cepas que produzcan pigmentos con la
672 menor cantidad posible de citrinina²⁷. Otra alternativa es investigar especies
673 no micotoxigénicas, en donde, distintas cepas de *Talaromyces* y *Penicillium*
674 han resultado de gran interés, ya que no han presentado micotoxinas, por lo
675 que podrían reemplazar a los pigmentos tipo *Monascus*. Sin embargo,
676 también se reportó que la especie *T. purpureogenus* puede producir las
677 micotoxinas rubratoxin A, rubratoxin B y luteoskyrin¹⁵. A partir de esto, se
678 vuelve necesario realizar estudios de detección y cuantificación que
679 garanticen que las micotoxinas se encuentren en concentraciones muy bajas
680 o que no estén presentes.

681 A continuación se muestra información obtenida a través del programa de
682 relaciones entre estructura y actividad ecológica, ECOSAR (Ecological
683 Structure Activity Relationships), que corresponde a un sistema de
684 predicción computarizado que estima la toxicidad acuática³⁰. En la Tabla 3
685 se presenta información relacionada a la toxicidad que tienen algunos
686 pigmentos de tipo azafilona que podrían estar presentes en las especies en
687 estudio.

688

689 **Tabla 3** Fisicoquímica y toxicidad de posibles pigmentos en los extractos de
 690 *P. murcianum* y *T. australis*³⁰.

Pigmento	PM (g/mol)	Solubilidad en agua (mg/L)	Log P	CL ₅₀ Pez 96 h (mg/L)	CL ₅₀ Dafnido 48 h (mg/L)	CE ₅₀ Alga verde 96 h (mg/L)
Rubropunctin	358,21	0,3022	5,486	0,23	0,23	0,22
Monankarin F	356,16	80,15	3,442	14,85	10,33	9,66
Monankarin A-B	358,14	2754	1,629	633,97	312,61	289,32
Monashexenone	320,20	86,53	2,976	34,95	22,25	20,76
Monaphilol D	412,48	173,8	1,965	364,07	191,34	177,43
Monaphilol A	384,19	11,23	3,562	12,51	8,90	8,33
Monaphilol B	356,16	114,9	2,579	88,37	52,18	48,56
Monascopyridine B	383,21	22,58	2,616	88,11	52,40	48,77
N-glutaryl- monascorubramine	511,22	0,4876	1,197	2209,66	1003,9	926,80
PP-V	411,17	2612	0,46	8164,14	3224,95	2964,64

691

692 Se observan valores de concentración letal del 50% (CL₅₀), para un modelo
 693 de pez y de dafnido, y se describen valores de concentración efectiva media
 694 (CE₅₀) en modelo de alga, es decir, la concentración en la cual un 50% de los
 695 organismos en estudio presenta algún efecto ante la exposición a los
 696 pigmentos. En general, se observa que la toxicidad aumenta a medida que
 697 aumenta el valor de log P, debido a que este valor se relaciona a la capacidad
 698 que tienen los compuestos para adherirse a las membranas plasmáticas por
 699 más tiempo y de esta forma ser más tóxicos. En este caso, Yuliana *et al.*
 700 (2018), definen que los valores de CL₅₀ y CE₅₀ mayores a 100 mg/L
 701 corresponden a baja toxicidad, en este caso los pigmentos monankarin A-B,

702 monaphilol D, N-glutaryl-monascorubramine y PP-V. Los de toxicidad
703 intermedia serian monankarin F, monashexenone, monaphilol A, monaphilol
704 B y monascopyridine B, y con una alta toxicidad estaría el pigmento
705 rubropunctin. Si bien la mayoría de los pigmentos tipo azafilona presentan
706 una baja o media toxicidad, se requiere analizar bien la composición de los
707 extractos con los que se desarrollaran productos, debido a que, si hay algunos
708 pigmentos que presentan un mayor grado de actividad biológica, lo que puede
709 conllevar a toxicidad. También se ha visto que pigmentos tipo azafilona como
710 monascin³¹ o pigmentos tipo hidroxiantraquinoide como danmacanthal³²
711 pueden presentar citotoxicidad selectiva, otorgándole un potencial uso como
712 antitumoral o anticancerígeno. Por lo que la evaluación antioxidante depende
713 harto de la aplicación que se le dará al pigmento.

714 Los pigmentos de las especies *T. australis* y *P. murcianum* fueron evaluados
715 por Hernández *et al.* (2018), en ensayos de citotoxicidad en un modelo celular
716 de piel, expuesto a lixiviados, obtenidos de muestras de lana teñida con estos
717 pigmentos fúngicos. Los resultados de los ensayos no mostraron ningún
718 efecto tóxico en las células analizadas³³. Estos antecedentes resultan
719 prometedores y dan cuenta de la posible seguridad que presentarían estos

720 pigmentos, convirtiéndolos en candidatos idóneos para nuevos ingredientes
721 cosméticos.

722

723 **Evaluación de propiedades antioxidantes.**

724 Las investigaciones de las propiedades antioxidantes en el Reino Plantae es
725 amplia y en el último tiempo se ha incluido el Reino Fungi. En plantas, ha
726 sido bien estudiado y demostrado que la actividad antioxidante se debe
727 principalmente a la presencia de polifenoles, siendo éstos los más
728 investigados y difundidos en la población debido a su alto consumo en la
729 dieta³⁴. Las acciones farmacológicas de los antioxidantes fenólicos se derivan
730 principalmente de sus propiedades captadoras de radicales libres y quelantes
731 de metales, así como de sus efectos sobre las vías de señalización celular y la
732 expresión génica³⁵. En el caso de los hongos, la actividad antioxidante podría
733 deberse principalmente, a policetidos como azafilonas e
734 hidroxiantraquinoides^{15,36}. En las azafilonas el potencial antioxidante se
735 atribuye principalmente a dos mecanismos diferentes: la reacción directa
736 entre radicales y los grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos, y la
737 transformación de la molécula en piridonas³⁷. Varios autores reconocen como
738 un paso clave, en la expresión de la actividad biológica de las azafilonas, la

739 producción de compuestos derivados de la 4-piridona. Esta molécula (junto
740 a su tautómero, el piridin-4-ol) se caracterizan por actuar como potentes
741 antioxidantes, dada la reactividad de los grupos vinilo. Si bien, el mecanismo
742 de transformación aún no está del todo esclarecido, se ha demostrado la
743 relación estructura-función de las piridonas obtenidas a partir de las
744 azafilonas³⁸. Los estudios descritos demuestran cómo las azafilonas y sus
745 derivados son capaces de ejercer un efecto antioxidante desde la perspectiva
746 farmacológica, así como en la conservación de alimentos³⁹. Pero también se
747 hace necesario proponer aplicaciones en el campo de las formulaciones
748 cosméticas¹⁷. Se ha descrito que algunos hongos filamentosos son capaces de
749 producir pigmentos coloreados, que debido a su naturaleza y diversidad
750 estructural, podrían tener un gran potencial de uso como cosmético
751 funcional^{17,40}. Lo que correspondería a un gran avance a nivel de la cosmética
752 debido a que se describen problemas de toxicidad con los tintes sintéticos de
753 uso tradicional que van desde una dermatitis o alergia hasta problemas de
754 genotoxicidad^{41,42}.

755 La actividad antioxidante puede ser evidenciada mediante diferentes ensayos
756 *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, resulta difícil extrapolar los resultados
757 reportados, dada la gran variedad de ensayos disponibles y las limitaciones

758 asociadas a cada uno de ellos³⁴. Aquí, para evaluar el efecto antioxidante se
759 utilizó en primer lugar el ensayo de capacidad de eliminación del radical libre
760 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Este ensayo se practica de forma
761 rutinaria para evaluar el potencial de eliminación de radicales libres de una
762 molécula antioxidante y se considera uno de los métodos colorimétricos
763 estándar y de fácil aplicación. El DPPH es un radical estable en solución y
764 tiene un color púrpura que absorbe a 515 nm en metanol. Este ensayo se basa
765 en el principio de que el DPPH[•] al aceptar un átomo de hidrógeno (H) de la
766 molécula depuradora (antioxidante), da como resultado la reducción de
767 DPPH[•] a DPPH₂, cambiando el color púrpura a amarillo con la disminución
768 concomitante de la absorbancia a 515 nm⁴³. Existe otro análisis de propiedad
769 antioxidante, considerado más completo, como es el ensayo de capacidad de
770 absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC), que según algunos autores
771 posee ventajas comparativas en relación a otros ensayos⁴⁴. Este índice permite
772 combinar en un solo parámetro, información sobre la cinética de oxidación
773 utilizando el área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia o
774 absorbancia de una sonda como la fluoresceína (ORAC-FL) o el rojo de
775 pirogalol (ORAC-PGR), la cual es desafiada por radicales peroxilo (AAPH).
776 El método está basado en la capacidad de las muestras de donar hidrógenos

777 a ROO^{*} (radical peroxilo) para formar hidroperóxido (ROOH) y el radical
778 estable (ArO^{*}). Por lo que el ensayo ORAC mide la actividad de los
779 antioxidantes que interrumpen cadena de radicales peroxilos⁴⁴. El
780 decaimiento de la fluorescencia de la proteína indica el daño recibido por
781 AAPH, por lo tanto, el retardo en el decaimiento de la fluorescencia indica
782 protección antioxidante. En el ensayo ORAC-FL los tiempos de inducción
783 están fuertemente influenciados por el número de grupos fenólicos presentes
784 en la muestra mientras que, en el ensayo ORAC-PGR, dichos tiempos
785 prácticamente no se observan y el decaimiento de la absorbancia se ve
786 influenciado principalmente por la reactividad de los fenoles de la muestra³⁴.
787 Para seleccionar el mejor método, se requiere realizar más estudios en
788 especies fúngicas locales, las que podrían convertirse en importantes fuentes
789 de pigmentos antioxidantes.

790

791 **Antecedentes de toxicidad en colorantes sintéticos.**

792 Actualmente se requieren excipientes de origen natural, con características
793 novedosas, como “colorantes funcionales” con bajo impacto toxicológico. En
794 el caso de los impactos que pueden generar los excipientes y/o aditivos que
795 forman parte de una formulación, existen varios ejemplos de toxicidad. Uno

796 de estos, son los colorantes sintéticos derivados azo, trifenilmetano y
797 xanteno, comúnmente utilizados en alimentos, textiles, cosméticos y
798 fármacos, que pueden presentar genotoxicidad⁴¹. Dicha actividad estaría
799 relacionada a la presencia de grupos funcionales, como los sustituyentes nitro
800 y amino que se metabolizan a electrófilos finales. Estabilizándose por
801 interacción electrónica con los anillos arilo^{41,42} y a través de la reducción
802 azoica, liberan aminas aromáticas, que pueden ser aún más tóxicas que los
803 compuestos originales⁴⁵. La correlación baja pero significativa entre la
804 carcinogenicidad en animales y los datos de pruebas a corto plazo puede
805 aumentar con un examen adicional, especialmente con ensayos de
806 cromosomas⁴¹. Dichos riesgos derivados de la exposición a estos colorantes
807 y la posibilidad de la inducción de la mutación de la línea germinal humana
808 son un interesante argumento para investigar nuevas fuentes de pigmentos
809 naturales, que sean igual o más efectivos que los sintéticos, pero sin
810 toxicidad. Otro riesgo que se ha asociado a colorantes orgánicos, como la p-
811 fenilendiamina (PPD), es el de actuar como alérgeno provocando dermatitis
812 y otras irritaciones e inflamaciones en la zona de contacto^{42,46,47,48}. La PPD se
813 encuentra principalmente en tintes capilares, generando un problema de salud
814 tanto a las personas usuarias de los tintes, como a quienes lo manipulan

815 constantemente en peluquerías y centros de estética^{49,50}. Según datos de la
816 confederación de consumidores y usuarios (CECU), el mercado de los tintes
817 para el cabello supuso el 8% de toda la cosmética vendida en la Unión
818 Europea durante el año 2004. Más del 60% de las mujeres y entre el 5 y 10%
819 de los varones se tiñen el pelo una media de 6-8 veces al año⁵¹. Por lo que, es
820 un cosmético muy utilizado y las opciones que se encuentran en el mercado
821 no siempre son las más inocuas. Esto debido a que la mayor parte de las
822 empresas de cosméticos, utilizan colorantes sintéticos, porque son más
823 baratos, más estables y más brillantes que los colorantes naturales. Si bien la
824 moda de cambiar el color del cabello se ha practicado en todas las épocas
825 históricas, en la actualidad existe un crecimiento en la demanda de productos
826 cada vez más sofisticados que permitan cambiar el color del pelo. A pesar
827 que las encuestas posicionan al género femenino como las mayores usuarias
828 de tintes para el pelo, hoy en día estos cosméticos son empleados por
829 personas de diversos géneros. Se utilizan principalmente para cambiar el
830 color natural del pelo, ya sea de forma temporal o permanente, eliminando
831 parte del tono existente y/o añadiendo uno nuevo. También se utilizan para
832 retrasar la aparición de las canas, o bien repigmentarlas cuando ya están
833 establecidas^{46,51}. Debido al masivo uso, los tintes de pelo resultan una gran

834 problemática de estudio, para disminuir la toxicidad y entregar un producto
835 más seguro a la población.

836

837 **Microencapsulación para mejorar la formulación.**

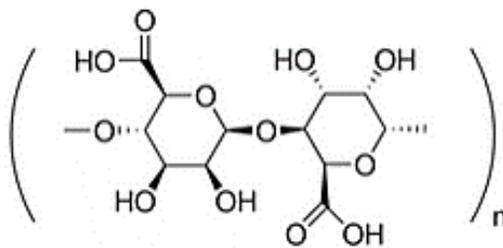
838 La inestabilidad de los colorantes de origen natural se podría revertir al
839 encapsular el pigmento de interés. Las técnicas de microencapsulación se
840 utilizan ampliamente en muchas aplicaciones industriales a nivel biológico,
841 alimentario, agroquímico, cosmético, textil, entre otras⁵². Este proceso
842 permite otorgar protección y diversas características a la sustancia que se está
843 encapsulando, según la aplicación que se quiera dar. Por ejemplo, para
844 proteger contra un medio ambiente adverso, estabilizar sustancias
845 farmacológicas sensibles y generar un sistema de liberación controlada o
846 prolongada del pigmento. De esta forma, se protege al pigmento de la
847 oxidación, luz, humedad, etc., y se podría mantener una coloración más
848 intensa y prolongada⁵³. La aplicación de sistemas de administración en
849 micropartículas para problemas farmacéuticos ha sido bien estudiada y se
850 avanza rápidamente en su desarrollo, debido a que esta tecnología permite⁵²:

- 851 • Proteger la sustancia activa en un medio ambiente adverso
- 852 • Estabilizar sustancias farmacológicas sensibles

- 853 • Eliminar incompatibilidades
- 854 • Enmascarar propiedades organolépticas desagradables (olor, sabor)
- 855 • Desarrollar formas de dosificación de liberación controlada o prolongada
- 856 • Mejorar la biodisponibilidad de los medicamentos convencionales
- 857 • Minimizar efectos secundarios y toxicidad

858 En la actualidad existen diversas técnicas para microencapsular moléculas
859 activas, las cuales se pueden diferenciar principalmente en métodos físicos,
860 químicos, y físico-químicos. Las técnicas más utilizadas para obtener
861 microencapsulados por métodos físicos son: secado por atomización (spray
862 drying), recubrimiento en lecho fluido, extrusión, evaporación de
863 disolventes, centrifugación y utilización de fluido supercrítico. Por otra parte,
864 los métodos químicos más comunes son: polimerización interfacial y
865 complejación de inclusión molecular. Por último, las técnicas fisicoquímicas
866 principales son: coacervación, liposomas y gelificación iónica^{52,54}. Dentro de
867 las diferentes técnicas de microencapsulación, la gelificación iónica es una
868 técnica que posee ciertas ventajas, ya que se puede trabajar con materias
869 primas biodegradables. Además, no requiere solventes orgánicos ni
870 condiciones extremas de temperatura y pH, que generan contaminantes y/o
871 que pueden afectar al principio activo⁵⁵. Los polímeros más empleados en

872 sistemas de gelificación reticulada, son alginato, quitosano, pectina, goma
873 gellan y carboximetilcelulosa. El alginato (Alg) presenta cualidades no
874 tóxicas, biodegradables y biocompatibles, así como propiedades gelificantes
875 superiores que permiten una fácil formación de gel en condiciones seguras y
876 suaves⁵⁶. El alginato deriva del ácido algínico, un compuesto químico que se
877 encuentra principalmente en la pared celular de algas marinas (*Laminarea*
878 *Hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrosystis pyrifera*). Comprende
879 hasta el 40% de su peso seco; y les otorgan rigidez, elasticidad y flexibilidad,
880 además el ácido algínico puede ser producido por bacterias no patógenas y
881 fijadoras de nitrógeno como las *Azotobacter vinelandii*⁵⁷. Como se observa
882 en la Ilustración 6⁵⁸, el alginato es un polisacárido lineal poliiónico, debido a
883 los grupos carboxílicos que posee a lo largo de su cadena⁵⁹.



888 **Ilustración 6** Estructura química del ácido algínico extraído de *Macrosystis*
889 *pyrifera*⁵⁴.

890

891 A partir de la estructura del ácido algínico, se deduce su capacidad
892 hidrofílica, que le confiere la cualidad de hidrocoloide. Este polímero se
893 encuentra formado por dos monómeros: β -D ácido manurónico (M), y α -L
894 ácido gulurónico (G) unidos por enlace β 1-4. Se encuentra estructurado por
895 bloques homopoliméricos del tipo bloques G (-GGG-), bloques M (-MMM-
896) o heteropolímeros, donde los bloques M y G se alternan (-MGMG-) como
897 se observa en la Ilustración 7⁶⁰.

898

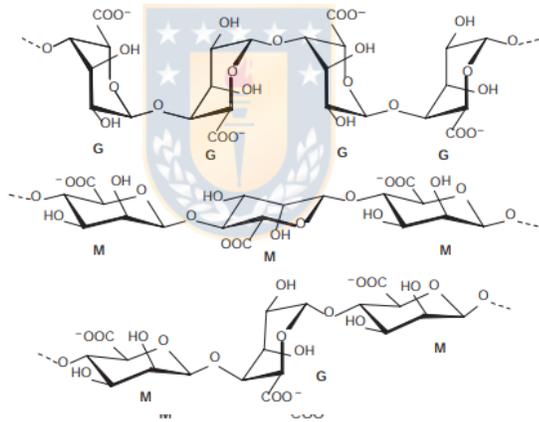
899

900

901

902

903

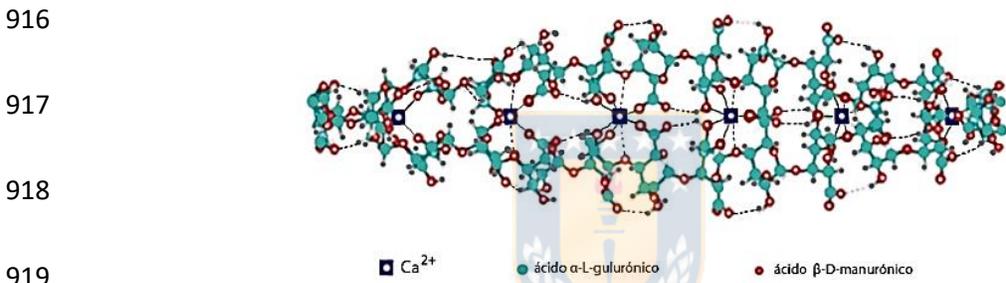


904 *Ilustración 7 Estructura de bloques G, M y MG del ácido algínico.*⁵⁶

905

906 La distribución de los monómeros en la cadena polimérica le otorgan diversas
907 propiedades al alginato, y si hay gran cantidad de bloques G el gel
908 generalmente es más fuerte y duro. Por otro lado, si hay mayor proporción de
909 bloques M el gel es más suave y elástico. Cuando dos cadenas de bloques G

910 se alinean se forman sitios de coordinación, debido al tamaño que queda entre
911 las cavidades que se forman al alinearse los bloques G. Un ion divalente, por
912 ejemplo, el calcio, es capaz de acomodarse entre estas cavidades. A partir de
913 esto, el alginato sufre cambios conformacionales, dando como resultado el
914 conocido modelo de gelificación de caja de huevo (egg-box)⁶¹, como se
915 observa en la Ilustración 8.



920 *Ilustración 8 Modelo de gelificación “egg-box” del alginato con el calcio⁵⁷.*

921

922 Entre las sales de alginato más utilizadas se encuentran las de sodio, ya que
923 son bastante solubles en agua fría y su transición de sólido a gel es instantánea
924 e irreversible⁶². El gel que forma el alginato es prácticamente independiente
925 de la temperatura, pero cuando es expuesto a tratamientos prolongados de
926 calor y variaciones extremas de pH, el polímero se degrada, provocando por
927 consecuencia pérdidas en las propiedades del gel. El alginato es un
928 polielectrolito, esta característica le confiere la capacidad de interactuar con

929 otras moléculas formando así, sistemas mixtos que mejoran las propiedades
930 estructurales del gel de alginato. La formación del gel comienza a partir de
931 una solución de sal de alginato y una fuente de ion divalente como el calcio,
932 la cual puede ser interna o externa⁶¹. El ion calcio difunde hasta la cadena
933 polimérica por lo que produce un reordenamiento en la estructura resultando
934 así un material sólido con las características de un gel. Las propiedades del
935 gel y la cinética de gelificación pueden depender del tipo de ion por el que se
936 encuentre compuesta la sal de alginato⁶³. En alginatos de potasio el proceso
937 de pasar de sólido a gel es mucho más veloz respecto a los alginatos de sodio
938 cuando son preparados a bajas concentraciones. Si se comparan las
939 propiedades de los geles de calcio formados con ambas sales (sodio y
940 potasio), estos resultan ser mucho más elásticos cuando son preparados a
941 partir de alginato de potasio comparado con los alginatos de sodio^{62,64}. El
942 proceso de gelificación externa ocurre al introducir la solución de alginato en
943 otra con presencia de iones calcio, esto se describe en la Ilustración 9⁶⁰.

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

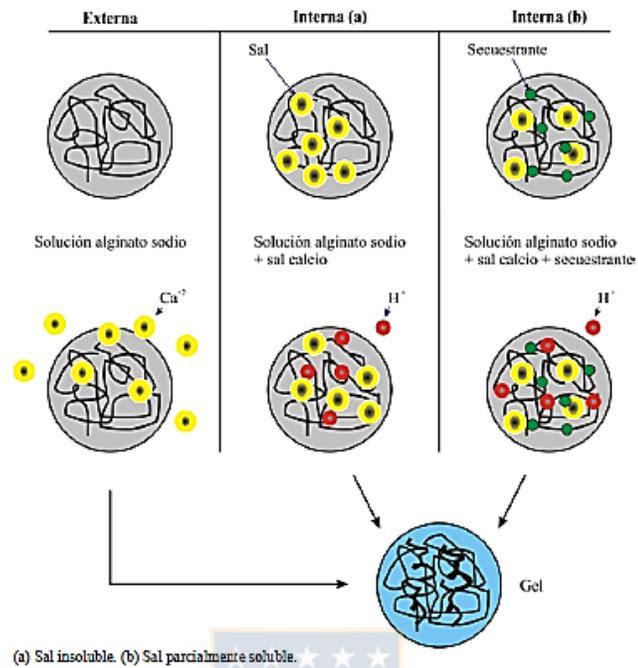
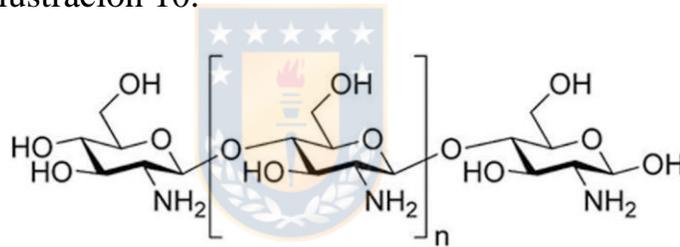


Ilustración 9 Mecanismos de gelificación iónica del alginato⁵⁶.

Por consecuencia, se produce la difusión del ion calcio desde la solución externa hasta la solución de la sal de alginato de pH neutro. La formación del gel se inicia en la interfase y avanza hacia el interior a medida que la superficie se encuentra saturada de iones calcio⁶⁰. De esta forma el ión sodio proveniente de la sal de alginato es desplazado por el catión divalente solubilizado en agua. Este interacciona con los bloques G de diferentes moléculas poliméricas, enlazándolas entre sí. La fuente de calcio más usada ha sido el CaCl_2 debido a su mayor porcentaje de calcio disponible, existen

966 otras sales empleadas con menor frecuencia tales como el acetato
967 monohidratado y el lactato de calcio^{62,63,65}.

968 Otro polímero que se puede utilizar es el quitosano (CS), que corresponde al
969 derivado más importante de la quitina que se prepara mediante la
970 desacetilación alcalina de ésta. La estructura del quitosano está compuesta
971 por unidades de 2-amino- 2 -desoxi-β- d -glucosa (d -glucosamina
972 desacetilada) y N- acetil- d- glucosamina enlazadas en β-1,4⁶⁶, como se
973 observa en la Ilustración 10.

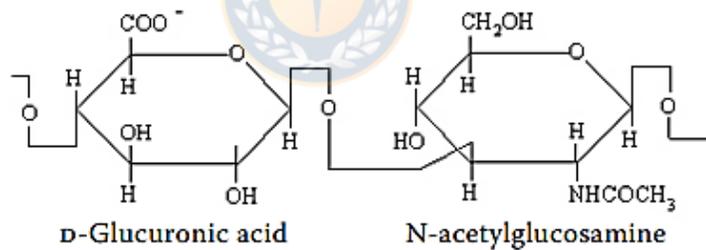


974
975
976
977 *Ilustración 10 Representación de la estructura química del quitosano⁶².*

978
979 Al quitosano se le conoce como un compuesto bioactivo que ha mostrado
980 numerosas propiedades biológicas como antitumoral, inmunoestimulante,
981 antimicrobiano y cicatrizante de heridas⁶⁶. Estas características más algunas
982 propiedades excepcionales como biodegradabilidad, biocompatibilidad,
983 capacidad no antigénica y un bajo costo en su producción, han dado lugar a
984 sus amplias aplicaciones farmacéuticas. Otras aplicaciones son como

985 sistemas de administración de fármacos, ingeniería de tejidos, tecnología
986 alimentaria, bioimagen, implantes, lentes de contacto, unión a proteínas e
987 industria textil⁶⁶.

988 Otro excipiente que puede ser utilizado en la formación de micropartículas y
989 potenciar su aplicación a nivel cosmético, es el ácido hialurónico (AH), un
990 mucopolisacárido que se encuentra naturalmente en todos los organismos
991 vivos. En la Ilustración 11 se describe el polisacárido hialuronano que
992 corresponde a un polianión lineal, con una estructura de poli-disacárido
993 repetida [(1 → 3) -β-dGlcNAc- (1 → 4) -β-d-GlcA-]⁶⁷.



998 *Ilustración 11 Estructura química del ácido hialurónico⁶³.*

999 El AH se encuentra principalmente en la matriz extracelular y la matriz
1000 pericelular, pero también se ha demostrado que existe intracelularmente⁶⁷.

1001 Las funciones biológicas del AH incluyen el mantenimiento de la
1002 elastoviscosidad de los tejidos conectivos líquidos. Algunas de las funciones
1003 son formar parte del líquido sinovial de las articulaciones, del vítreo ocular,

1004 en el control de la hidratación de los tejidos y el transporte de agua⁶⁷. Otras
1005 funciones son el ensamblaje supramolecular de proteoglicanos en la matriz
1006 extracelular y numerosas funciones mediadas por receptores en el
1007 desprendimiento de células, mitosis, migración, desarrollo de tumores y
1008 metástasis e inflamación. Su consistencia y su compatibilidad con los tejidos
1009 permiten que se utilice en productos para el cuidado de la piel como un
1010 excelente humectante⁶⁷. El ácido hialurónico es una de las moléculas más
1011 hidrófilas de la naturaleza y puede describirse como un humectante natural.
1012 La naturaleza viscoelástica única de AH junto con su biocompatibilidad y no
1013 inmunogenicidad ha llevado a su uso en diversas aplicaciones clínicas, como
1014 facilitar la cicatrización y regeneración de heridas quirúrgicas⁶⁷.

1015 Con respecto a la compatibilidad entre los polímeros, es posible que el
1016 hidrogel Alg-AH se forme al obtener una estructura de red polimérica
1017 interpenetrante, en la que la red Alg está reticulada por iones Ca^{2+} para
1018 proporcionar un refuerzo estructural⁶⁸. Se espera que la red AH se integre en
1019 esta estructura a escala molecular, pero sin formación de enlaces covalentes.
1020 Se espera la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxilato
1021 del Alg y la amida de la N-acetil- d- glucosamina del AH⁶⁸.

1022 En este trabajo se profundizará en la técnica de microencapsulado por
1023 gelación iónica con vibración asistida por un encapsulador B-390 de BÜCHI,
1024 que presenta las siguientes características:

- 1025 • Obtención de microperlas monodispersas y microcápsulas.
- 1026 • Elección de diámetros de partículas entre 80 μm y 4000 μm .
- 1027 • Encapsulación de microorganismos, sustancias orgánicas e
1028 inorgánicas.
- 1029 • Proceso de encapsulación eficiente y reproducible.
- 1030 • Distribución de tamaño de partícula excepcionalmente ajustada.
- 1031 • Optimización de procesos de manera fácil y rápida gracias a la
1032 visualización de la formación de gotas.
- 1033 • Sistema de boquilla de vibración por flujo de aire para producir perlas
1034 (diámetro 80-1000 μm) a partir de polímeros altamente viscosos ⁶⁹.

1035 A continuación, en la Ilustración 12, se esquematiza el proceso del
1036 encapsulador B-390, señalizando las partes fundamentales para la producción
1037 de micropartículas o perlas⁷⁰.

1038

1039

1040

1041

1042

1043

1044

1045

1046

1047

1048

1049

1050

1051

1052

1053

1054

1055

1056

1057

1058

1059

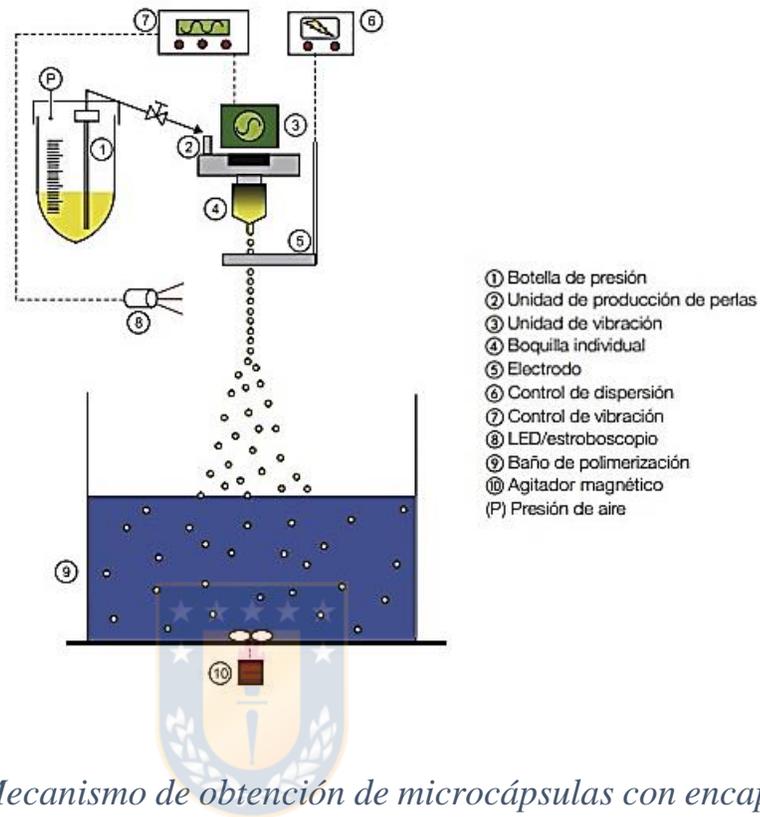


Ilustración 12 Mecanismo de obtención de microcápsulas con encapsulador

B-390⁶⁶.

El encapsulador permite optimizar el proceso modificando ciertos parámetros como el tamaño de la boquilla, la frecuencia de vibración, velocidad de flujo, tensión de electrodo y viscosidad, los cuales influyen en el tamaño de la micropartícula y en la productividad del proceso⁷¹. Al ajustar estos parámetros se obtiene un tamaño de micropartículas reproducible y uniforme entre producciones, con un intervalo de tamaños entre 0,15 mm a 2,0 mm. Gracias a la unidad de dispersión electrostática integrada (EDU); presenta

1060 aproximadamente un 5 % de desviación estándar relativa del tamaño de las
1061 perlas usando alginato puro. Existe un control inmediato del proceso a través
1062 del monitoreo visual facilitado por la luz de la lámpara estroboscópica. El
1063 tamaño del lote obtenido va de 5 mL a 1000 mL, y el volumen muerto es de
1064 aproximadamente 2 mL. Presenta un conjunto de 8 boquillas individuales
1065 cuyos tamaños son 0,08, 0,12, 0,15, 0,20, 0,30, 0,45, 0,75 y 1,0 mm,
1066 cubriendo la gama de tamaños de las micropartículas de aproximadamente
1067 0,15 mm a 2,0 mm. El equipo presenta una alta producción de perlas o
1068 micropartículas. Se producen hasta 6.000 por segundo dependiendo de las
1069 condiciones de encapsulación y de la mezcla de polímeros. El rango de
1070 presión de aire con que se trabaje depende de la mezcla de polímeros que se
1071 utilice con velocidades de flujo de 70 mL/h en boquilla de 0,08 mm y de 2500
1072 mL/h para boquilla de 1,0 mm⁷¹. En la Ilustración 13, se detalla información
1073 entregada por los fabricantes del encapsulador B-390, donde describen la
1074 influencia de parámetros en tamaño de micropartículas y productividad, y la
1075 optimización de parámetros durante el proceso.

1076

1077

1078

1079

Process parameters influencing bead size and productivity

Parameter	Nozzle size	Vibration frequency	Flow rate	Electrode tension	Viscosity
Result	↑	↑	↑	↑	↑
Bead size	↑	↓	↑	↑	↑
Productivity	↑	↑	↑	—	—

1080

1081

1082

Adaption of process parameters with higher viscosity

1083

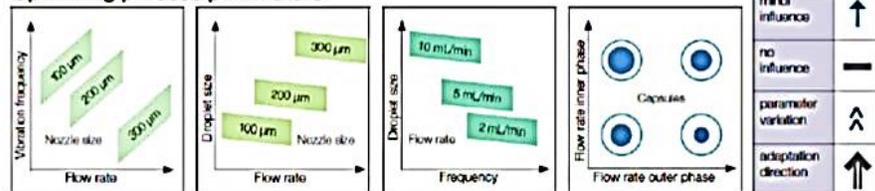
Viscosity ↑	↑↑	↓↓	↑↑	↑↑	high influence ↑
					moderate influence ↑
					minor influence ↑
					no influence —
					parameter variation ↑
					adaptation direction ↑↑

1084

Optimizing process parameters

1085

1086



1087

1088

1089

1090

1091 A partir de la ilustración 13, que corresponde a información entregada por

1092 los proveedores, se observa la alta influencia que tiene la boquilla, en el

1093 tamaño de la micropartícula y la productividad del proceso⁷¹. Debido a que,

1094 una mayor boquilla conlleva un mayor tamaño de partícula, y con esto

1095 además una mayor productividad, que se puede medir como mayor eficiencia

1096 de encapsulación. Otro parámetro es la frecuencia vibratoria, la que, al

1097 aumentar, disminuye el tamaño de partícula con una moderada influencia y

1098 aumenta la productividad con una menor influencia. En el caso de la
1099 velocidad de flujo al aumentar, se presenta un aumento con influencia
1100 moderada del tamaño de las micropartículas, en el caso de la productividad
1101 esto presenta una alta influencia. La tensión del electrodo tiene una menor
1102 influencia en el aumento del tamaño de partícula. La viscosidad también tiene
1103 una menor influencia en el aumento del tamaño de partícula. Pero además en
1104 los procesos de mayor viscosidad se adopta una influencia en todos los otros
1105 parámetros. Por un lado, aumentando el tamaño de partícula, la tasa de flujo
1106 y la tensión del electrodo, y por otro disminuyendo la frecuencia de vibración.
1107 Además, se presentan graficas que facilitan la optimización de parámetros, la
1108 primera describe gráficamente, como a mayor frecuencia de vibración y
1109 menor tasa de flujo, el tamaño de micropartícula disminuye. Por otro lado, a
1110 mayor tasa de flujo y mayor tamaño de gota, el tamaño de micropartícula
1111 también aumenta. A menor frecuencia y mayor tamaño de gota, la tasa de
1112 flujo aumenta. Por último, también existe influencia en la fase interna del
1113 caudal con respecto a la fase externa, lo que es válido cuando se incluye la
1114 utilización de boquillas concéntricas. Cuando no se ocupan boquillas
1115 concéntricas, se utiliza una solución con ambas fases disueltas entre sí, y por

1116 lo tanto el principio activo puede estar disperso en cualquier zona de la
1117 micropartícula.

1118

1119

1120

1121

1122

1123

1124

1125

1126

1127

1128

1129

1130

1131

1132

1133



1134 **Hipótesis y Objetivos**

1135

1136 Este análisis lleva a la siguiente Hipótesis:

1137

1138 “Los pigmentos naturales producidos por hongos filamentosos, al ser
1139 encapsulados, podrían ser utilizados como ingredientes cosméticos
1140 funcionales”.

1141

1142 **Objetivo general:**



1143

1144 Caracterizar las propiedades químicas y antioxidantes de los pigmentos
1145 extracelulares producidos por *Talaromyces australis* y *Penicillium*
1146 *murcianum* y evaluar sus usos potenciales como ingredientes cosméticos
1147 microencapsulados.

1148

1149

1150

1151

1152

1153 **Objetivos específicos:**

1154

1155 I) Realizar una caracterización química de los pigmentos presentes en los
1156 extractos de *T. australis* y *P. murcianum*.

1157

1158 II) Evaluar las propiedades antioxidantes de los pigmentos presentes en los
1159 extractos de *T. australis* y *P. murcianum*.

1160

1161 III) Evaluar la factibilidad de microencapsular los pigmentos de *T. australis*
1162 y *P. murcianum*.



1163

1164 IV) Caracterizar fisicoquímicamente los microencapsulados de los
1165 pigmentos de *T. australis* y *P. murcianum*.

1166

1167

1168

1169

1170

METODOLOGÍAS

1171

1172

1173

1174 **1. Obtención de materia prima.**

1175 Se utilizaron los caldos de cultivos de las cepas de los hongos filamentosos

1176 *Penicillium murcianum* PM 2015 y *Talaromyces australis* TA 2015,

1177 pertenecientes a la colección de cultivos del Laboratorio de Biotecnología de

1178 Hongos, Universidad de Concepción Campus Los Ángeles y del Centro de

1179 Biotecnología de la Universidad de Concepción, Campus Concepción,

1180 depositadas en el Banco de Recursos Microbianos del Instituto de

1181 Investigaciones Agropecuarias (INIA). Los hongos fueron cultivados en

1182 medios nutritivos optimizados³³ y luego de un periodo de 20 días de

1183 incubación a 25°C fueron recolectados y separados de la biomasa micelial

1184 por filtración en papel. Los caldos filtrados conteniendo los pigmentos

1185 extracelulares de cada especie fueron congelados a -18°C y mantenidos en

1186 estas condiciones hasta su uso.

1187

1188 **2. Purificación de extractos.**

1189 Para separar los pigmentos del caldo filtrado, inicialmente se utilizó una

1190 columna de vidrio de 60x10 cm, rellena con resina polimérica Amberlite

1191 XAD-16 (hydrophobic polyaromatic resins, Sigma-Aldrich). Para ello, se
1192 adicionó una cantidad determinada de cada filtrado a la columna y una vez
1193 adsorbido el color sobre la resina, se procedió a lavar varias veces con agua
1194 destilada hasta que el sobrenadante se tornara transparente. Luego los
1195 pigmentos adsorbidos fueron eluidos de la columna con etanol, y las
1196 fracciones colectadas se concentraron con un rota-evaporador Heidolph
1197 (Schwabach, Germany) hasta sequedad, generando un extracto bruto marrón-
1198 amarillo para *P. murcianum* y rojo para *T. australis*. El rendimiento de los
1199 extractos brutos fue expresado por cantidad de extracto en un volumen de
1200 caldo de cultivo filtrado (*mg extracto / mL filtrado*).

1201

1202 **3. Fraccionamiento por Cromatografía de Partición Centrifuga (CPC).**

1203 Los extractos crudos se fraccionaron utilizando el cromatógrafo de partición
1204 centrífuga Spot-CPC 250-L de CPC Armen Instruments (Armen, Francia)
1205 con un volumen celular total de 250 mL y una válvula de conmutación de
1206 cuatro vías que permite el funcionamiento en los modos descendente o
1207 ascendente. El sistema CPC se conectó a un sistema SPOT.PREP II, con
1208 detector UV integrado y recolector de fracciones y paquete de software
1209 Armen Glider. La separación por CPC se realizó en modo descendente con

1210 un sistema disolvente de dos fases compuesto de acetato de etilo / butanol /
1211 agua 1 / 1 / 2 v / v / v para *P. murcianum* y 4 / 1 / 5 v / v / v para *T. australis*.
1212 En la segunda especie se desarrolló otra prueba con un sistema de fase
1213 butanol / agua 1 / 1 v / v para mejorar la separación de los pigmentos más
1214 polares. La mezcla de solventes fue generada automáticamente por la unidad
1215 SPOT-PREP-II. El rotor de CPC se llenó primero con fase orgánica a 30 mL
1216 / min y una rotación de 500 rpm. La fase inferior se bombeó al sistema en
1217 modo descendente a un caudal de 24 mL / min y se aumentó la rotación a
1218 2200 rpm para *P. murcianum* y 1800 rpm para *T. australis*. Una vez
1219 alcanzado el equilibrio, las muestras se disolvieron en 10 mL de mezcla 1:1
1220 de capas superior e inferior y se inyectaron en el sistema CPC (bucle de
1221 muestra de 10 mL). La elución se controló utilizando un barrido general de
1222 200-600 nm y líneas de detección específicas a 254, 420 y 520 nm de longitud
1223 de onda, recogiendo entre 40-45 fracciones en tubos de 20 mL. Las fracciones
1224 se analizaron por HPLC y aquellas con una composición similar se
1225 combinaron en fracciones de acuerdo con sus espectros UV-Vis en línea
1226 obtenidos del detector preparativo. Las muestras que presentaron mayor
1227 cantidad de pigmento puro fueron seleccionadas.

1228 Se realizaron otras pruebas preliminares en equipo cromatografo en contra-
1229 corriente líquido-liquido de lecho móvil verdadero TMB-500 Armen
1230 Instruments (Armen, Francia).

1231

1232 **4. Análisis por cromatografía de capa fina de alta eficiencia (HPTLC).**

1233 Otra técnica de separación de pigmentos es la cromatografía de capa fina, la
1234 cual es muy útil cuando se trabaja con mezclas complejas⁷². Se trabajó con
1235 un equipo CAMAG® Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4) (Swiss) en las
1236 muestras con pigmentos mayoritarios. Para esto se utilizó una fase móvil de
1237 n-hexano / acetato de etilo / acido fórmico (24 / 18 / 1), luego una fase móvil
1238 de 2-butanol / acetato de etilo / acido fórmico (4,0 / 0,9 / 0,1) y una tercera
1239 fase móvil de acetonitrilo / agua / acido fórmico (8,0 / 1,9 / 0,1), después de
1240 cada desarrollo se capturaron imágenes con CAMAG® Reprostar 3 (Swiss)
1241 con luz visible, ultravioleta (254 nm) y fluorescente (366 nm).

1242

1243 **5. Análisis de fracciones por cromatografía líquida de ultra alta**
1244 **eficiencia (UHPLC) con un detector de arreglo de diodos (DAD) y**
1245 **espectrometría de masas en tándem (MS y MS-MS).**

1246 La metodología se desarrolló según lo descrito para pigmentos tipo
1247 *Monascus*⁷³ con modificaciones. Se utilizó una columna Kromasil 100-5-
1248 Phenyl de 4.6x250 mm, particle size 5 µm, serie M05PHA25/E164679 y una
1249 temperatura de horno de columna de 40°C. El volumen de inyección fue de
1250 20 µL para todas las muestras. Se estableció un gradiente de fase móvil
1251 compuesta por 0,2% de ácido fórmico en agua (solvente A) y por 0,2% de
1252 ácido fórmico en metanol (solvente B), en el cual, a los 0 min se comenzó
1253 con un 55% del solvente B, aumentando gradualmente a 90 % a los 15 min,
1254 y durante los siguientes minutos se equilibró el gradiente hasta llegar a las
1255 proporciones del sistema de fases inicial a los 30 min. Se realizaron ensayos
1256 con una velocidad de flujo de 0,6 y 1 mL/min. Se trabajó con ionización de
1257 electrospray (ESI) en polaridad negativa, y se hicieron dos tipos de análisis
1258 Modo Scan (MS) y Product Ion Scan (MS-MS). Los valores de masa
1259 registrados fueron de 50-2000 *m/z*.

1260

1261 **6. Evaluación de propiedad antioxidante mediante ensayo con radical**
1262 **libre DPPH.**

1263 Las actividades antioxidantes de las muestras fueron evaluadas según la
1264 estabilización de radicales DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl), para el
1265 diseño de la metodología se utilizó información de distintos estudios
1266 relacionados^{43,74}. Para esto, se comenzó mezclando 40 µL de solución del
1267 extracto total y de las fracciones de *P. murcianum* y *T. australis* por separado
1268 en concentraciones cercanas a 1 mg/mL, con 160µL de solución de metanol
1269 DPPH (40 mg/L). La absorbancia de la mezcla se midió utilizando un
1270 espectrofotómetro con lector de microplacas, a una longitud de onda de 517
1271 nm. Se utilizó hidroquinona a 1mg/mL como control positivo. Se evaluaron
1272 distintas concentraciones de las muestras que presentaron la mayor actividad
1273 para obtener una curva de calibración. La concentración de la muestra que
1274 logró una actividad de 50% de inhibición de DPPH se definió como la IC₅₀.
1275 La actividad para la eliminación de radicales libres DPPH se calculó de
1276 acuerdo con la ecuación⁴³:

1277
$$\text{DPPH (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

1278 Se realizó un ensayo de cinética para observar el efecto en el tiempo, para
1279 esto se hizo el procedimiento de lectura descrito anteriormente y se midió la
1280 absorbancia cada 3 minutos durante 90 minutos.

1281 Las absorbancias obtenidas en el ensayo de DPPH fueron interpoladas en una
1282 curva de calibración de trolox, elaborada a partir de las siguientes
1283 concentraciones 0,005, 0,010, 0,015, 0,020, 0,025, 0,030, 0,035, 0,040,
1284 0,045, 0,050 y 0,055 mg/mL a las que se les midió la absorbancia al
1285 reaccionar con una solución de reactivo DPPH.

1286

1287 **7. Evaluación de propiedad antioxidante mediante ensayo de capacidad** 1288 **de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).**

1289 Se evaluaron los extractos brutos y las fracciones de ambas especies, a través
1290 del monitoreo del decaimiento de fluorescencia en un blanco de fluoresceína
1291 oxidada por el radical 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide)
1292 dihydrochloride (AAPH), a través de la lectura en un espectrofotómetro de
1293 fluorescencia Perkin Elmer (Waltham, MA, USA). El ensayo ORAC-FL se
1294 realizó de acuerdo con Ou *et al.*, (2013)⁴⁴, con leves modificaciones. En una
1295 placa negra de 96 pocillos se añadieron 150 μ L de fluoresceína 0,11 μ M a
1296 cada pocillo. Luego a cada pocillo se adicionó 25 μ L buffer fosfato (blanco),

1297 trolox (curva estándar entre 6,25-50 μM) o muestra. Se dejó incubar en el
1298 lector de microplaca por 30 minutos a 37°C. Luego se agregó rápidamente 25
1299 μL de AAPH a cada pocillo, para comenzar la lectura cinética
1300 inmediatamente entre 0 y 120 minutos, midiendo cada 1 minuto, con una
1301 longitud de onda de excitación y de emisión de 485 y 530 nm,
1302 respectivamente a 37 °C. La recta de calibrado se obtuvo a través de la
1303 ecuación de una regresión lineal del área bajo la curva (AUC) de disminución
1304 de fluoresceína versus la concentración de trolox. Una vez obtenida la recta
1305 de calibrado, los valores de ORAC para las muestras, se obtuvieron
1306 calculando los equivalentes de trolox a partir del AUC de las muestras,
1307 extrapolando en la ecuación de la recta de calibrado y representándolos frente
1308 a la concentración de extracto.

1309

1310 **8. Elaboración de microcápsulas por gelación iónica con vibración** 1311 **asistida.**

1312 Se elaboraron microcápsulas híbridas de alginato de sodio, ácido hialurónico
1313 y quitosano, según las indicaciones encontradas en el manual operativo del
1314 microencapsulador B-390 BÜCHI (Flawil, Switzerland)⁷¹ y complementado
1315 con literatura necesaria para la determinación de las concentraciones de

1316 polímeros^{68,75,76}. Para esto, se disolvió una cantidad de extracto de los caldos
1317 de cultivos de *T. australis* y *P. murcianum* por separado, en 100 mL de una
1318 mezcla de alginato de sodio 1,3% y ácido hialurónico 0,07% (95/5). Para la
1319 formación de las microcápsulas se realizó una gelación iónica con boquilla
1320 vibratoria a través de un encapsulador B-390. Las microgotas expulsadas del
1321 equipo fueron recibidas por un baño iónico de una mezcla de cloruro de calcio
1322 0,2 M y quitosano 0,2 % (3/1) en agitación constante durante todo el proceso.
1323 Posterior a esto, las microcápsulas cargadas fueron filtradas al vacío a través
1324 de filtro de membrana de 10 μm , lavadas con 200 mL de agua nanopura y
1325 congeladas a -20°C . Las microcápsulas fueron secadas en un liofilizador
1326 Xiang Yi LGJ-10C (China) durante 24 h. Una vez secas fueron masadas para
1327 calcular el rendimiento, envasadas en tubos plásticos dentro de un frasco con
1328 sílica y refrigeradas hasta su posterior utilización. En la Tabla 4 se detallan
1329 las cantidades utilizadas para cada lote de micropartículas.

1330

1331

1332

1333 **Tabla 4** Cantidad utilizada para cada uno de los componentes necesarios en
 1334 la formación de microcápsulas obtenidas por gelación iónica.

Extracto fúngico	Lote	Pigmentos (mg)	Alginato de sodio (mg)	Ácido hialurónico (mg)	Quitosano (mg)	Cloruro de calcio dihidratado (mg)
TA4	TA4a	14,7	1300	-	-	2200
	TA4b	14,7	1235	35	-	3000
	TA4c	58,8	1235	35	-	5800
	TA4d	58,8	1235	35	-	5800
	TA4e	58,8	1235	35	100	4350
PM4	PM4a	26,4	1300	-	-	2200
	PM4b	26,4	1235	35	-	3000
	PM4c	79,2	1235	35	-	5800
	PM4d	79,2	1235	35	-	5800
	PM4e	79,2	1235	35	100	4350
TA5	TA5a	129,0	1235	35	100	4350
	TA5b	129,0	1235	35	100	4350
PM5	PM5a	86,1	1235	35	100	4350
	PM5b	86,1	1235	35	200	4350
	PM5c	86,1	1235	35	100	4350
	PM5d	86,1	1710	35	100	4350

1335

1336 En la Tabla 5 se detallan los parámetros fijados en el equipo durante cada una
 1337 de las partidas de producción de microcápsulas.

1338

1339 **Tabla 5** *Parámetros ajustados en el equipo, que fueron utilizados para cada*
 1340 *lote en la elaboración de las micropartículas.*

1341

Extracto fúngico	Lote	Frecuencia (Hz)	Electrodo (V)	Presión (mbar)	Flujo (mL/min)	Temperatura boquilla (°C)	Boquilla (µm)
TA4	TA4a	2110	1100	221	22,5	40,0	300
	TA4b	1200	2300	390	7,5	39,8	300
	TA4c	1500	2300	400	10	40,7	300
	TA4d	1500	2300	478	5,6	39,9	300
	TA4e	1500	2300	529	9,0	39,6	300
PM4	PM4a	2110	1100	228	18,0	40,0	300
	PM4b	800	2500	396	10,0	39,6	300
	PM4c	1500	2000	461	6,9	40,3	300
	PM4d	1500	2000	482	6,0	39,7	300
	PM4e	1500	2000	480	9,0	40,3	300
TA5	TA5a	1500	2300	422	8,0	40,6	300
	TA5b	700	2300	462	8,2	40,3	300
PM5	PM5a	1500	2000	486	8,5	40,7	300
	PM5b	1500	2000	555	8,6	40,3	300
	PM5c	400	2000	229	15,4	40,1	450
	PM5d	300	2500	246	18,0	39,9	450

1342

1343 **9. Determinación del color de las micropartículas de pigmentos fúngicos.**

1344 Se midió el color de distintos lotes de microencapsulados en un
 1345 espectrofotómetro CM-5 Konica Minolta (NJ, USA). Para esto se tomaron
 1346 muestras de aproximadamente 0,60 g, las que fueron depositada en una placa
 1347 de plástico transparente. Luego se realizaron las lecturas de las muestras, las
 1348 que se expresaron en las coordenadas CIE L*a*b*⁷⁷. El sistema colorimétrico

1349 CIE L*A*B* se interpretó de la siguiente manera: L*indica luminosidad
1350 leído de 0 (negro) a 100 (blanco). El positivo a*el valor indica el color rojo
1351 mientras que el valor negativo a* representa el color verde. De manera
1352 similar, los valores b* positivos y negativos indican los colores amarillo y
1353 azul, respectivamente. En una rueda de colores, los valores cercanos al
1354 centro, en el mismo valor L*, indican colores apagados o grises, mientras que
1355 los valores cerca de la circunferencia representan colores vivos o brillantes⁷⁸.
1356 Además, a partir de las coordenadas se calculan los valores c* que indica
1357 saturación y h* que corresponde al tono.



1358
1359 **10. Análisis de la morfología de las micropartículas mediante**
1360 **microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.**

1361 A través de un microscopio óptico Primo Star Zeiss (Germany), con un
1362 aumento de 4X, se analizaron muestras de las micropartículas, con la
1363 finalidad de evaluar el proceso de microencapsulación. Se utilizaron muestras
1364 en tres estados: recién elaboradas y suspendidas en el baño iónico, liofilizadas
1365 y rehidratadas luego de ser secadas. También se realizó un análisis en
1366 microscopio electrónico de barrido (SEM) Tescan Vega 3 SBU Easyprobe
1367 (Kohoutovice, Czech Republic) en el Centro de Microscopia Avanzada CMA

1368 Bio-Bio. En este caso se utilizaron solo muestras liofilizadas. A cada muestra
1369 se le hizo un recorrido general con una magnificación de alrededor de 70X.
1370 Luego se realizaron capturas de imágenes aumentando la magnificación hasta
1371 20 veces más para observar detalles estructurales. La morfología se definió
1372 según la clasificación descrita en la USP 30⁷⁹ para microscopía óptica.

1373

1374 **11. Análisis de tamaño y distribución de tamaño de partícula mediante**
1375 **microscopía óptica.**

1376 En las muestras seleccionadas, se midió el diámetro de 300 micropartículas
1377 con microscopio óptico Primo Star Zeiss (Germany). El diámetro se
1378 determinó con la medida de Diámetro de Feret descrita en la Farmacopea de
1379 Estados Unidos N°30 (USP 30)⁷⁹. Esta corresponde a la distancia entre líneas
1380 paralelas imaginarias tangentes a una partícula orientada de forma aleatoria
1381 y perpendicular a la escala del ocular. Estos datos fueron procesados en una
1382 tabla de distribución de frecuencias ordenadas por intervalos de clase, para
1383 así obtener los diámetros medios (DAV, DVS, DS y DV), geométricos y
1384 estadísticos⁸⁰⁸¹.

1385

1386 **12. Medición de la eficiencia de encapsulación por método**
1387 **espectrofotométrico.**

1388 El análisis se basó en la metodología de Aizpurua-Olaizola *et al.* (2015)⁸² con
1389 modificaciones. Se trituró con un mortero una masa de micropartículas lo
1390 más finamente posible. A partir de esto, se tomaron 3 muestras para cada una
1391 de las especies, se adicionaron 7,5 mL de citrato de sodio 0,3 M, se sometió
1392 a agitación de alta frecuencia con un Ultra Turrax® IKA T18 digital
1393 aumentando gradualmente la frecuencia hasta 21000 rpm, para así obtener
1394 una mezcla homogénea. Luego a estas muestras se les aplicó un baño de
1395 ultrasonido ELMA Transsonic 820/H por 2 h. Una vez finalizado este
1396 proceso se agregó 15 mL de metanol para precipitar el polímero y obtener un
1397 extracto de los pigmentos. Dicho extracto fue evaluado por
1398 espectrofotometría UV-Vis en un espectrofotómetro Cary 50 conc Varian
1399 (Pittsburgh, USA) a una longitud de onda de 400 nm para *P. murcianun* y
1400 490 nm para *T. australis*.

1401

1402 **13. Análisis estadístico.**

1403 Los datos se evaluaron mediante estadística descriptiva [media, desviación
1404 estándar (DE) y desviación estándar relativa (RSD)]. Las calibraciones se

1405 establecieron aplicando un modelo de regresión lineal. La comparación del
1406 área bajo la curva se realizó utilizando el software GraphPad (San Diego, CA,
1407 USA) Prism 6.01.

1408

1409

1410

1411



1412

1413

1414

1415

1416

1417

1418

1419

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1420

1421

1422 **1. Obtención de materia prima.**

1423 Gracias a los avances de la biotecnología se han desarrollado métodos de
1424 cultivo de hongos filamentosos que generan buen rendimiento y
1425 estandarización de la materia prima⁸³. Entre otras ventajas se reduce el
1426 impacto a la fuente natural, en este caso el bosque nativo chileno¹⁸. Es por
1427 esto que en la presente investigación las muestras fueron entregadas
1428 directamente por parte del equipo de profesionales que realizaron el cultivo
1429 a nivel de laboratorio en un biorreactor.

1430 En la Tabla 6 se detallan los volúmenes de muestras entregados y los medios
1431 de cultivo utilizados.

1432

1433

1434

1435

1436

1437 *Tabla 6 Muestras utilizadas en la presente investigación, los medios de*
 1438 *cultivos utilizados y los volúmenes entregados.*

Muestra	Medio de cultivo	Cantidad (mL)
TA1	Glucosa, peptona y extracto de levadura	500
TA2	Glucosa, peptona y extracto de levadura	1150
TA3	Glucosa, peptona y extracto de levadura	500
TA4	Extracto de malta (inoculado: 14-10-19; filtrado: 14-11-19)	850
TA5	Extracto de malta (inoculado: 19-2-21; filtrado: 8-3-21)	620
PM1	Glucosa, peptona, extracto de levadura, NaCl y Fe	350
PM2	Glucosa, peptona, extracto de levadura, NaCl	1200
PM3	Glucosa, peptona, extracto de levadura, NaCl	1000
PM4	Extracto de malta , estático más 5 días en agitación a 100 rpm	900
PM5	Extracto de malta	250

1439

1440 Conociendo la información de los medios de cultivo se puede deducir
 1441 algunos de los compuestos que pueden ser separados a través de la columna
 1442 de amberlita. Esto correspondería a compuestos altamente solubles, como
 1443 cloruro de sodio, hierro, glucosa y otros azúcares derivados de los extractos
 1444 de levadura y malta.

1445

1446 **2. Purificación de extractos.**

1447 La purificación es un punto crucial en el tratamiento de las muestras, ya que
 1448 de esto depende que no se produzcan interferencias en los análisis posteriores
 1449 o incluso en el desarrollo de un producto. En este caso se realizó la

1450 purificación de los caldos de cultivo en una columna con amberlita XAD-16,
1451 cuyo propósito fue separar sales y compuestos altamente solubles en agua,
1452 presentes en los caldos y que pudieran interferir en los análisis posteriores.
1453 En la Ilustración 14 se observa a los extractos brutos siendo separados en
1454 columna con amberlita, y a los extractos secos ya purificados, de coloración
1455 rojiza para *T. australis* y café claro para *P. murcianum*.

1456

1457

1458

1459

1460

1461

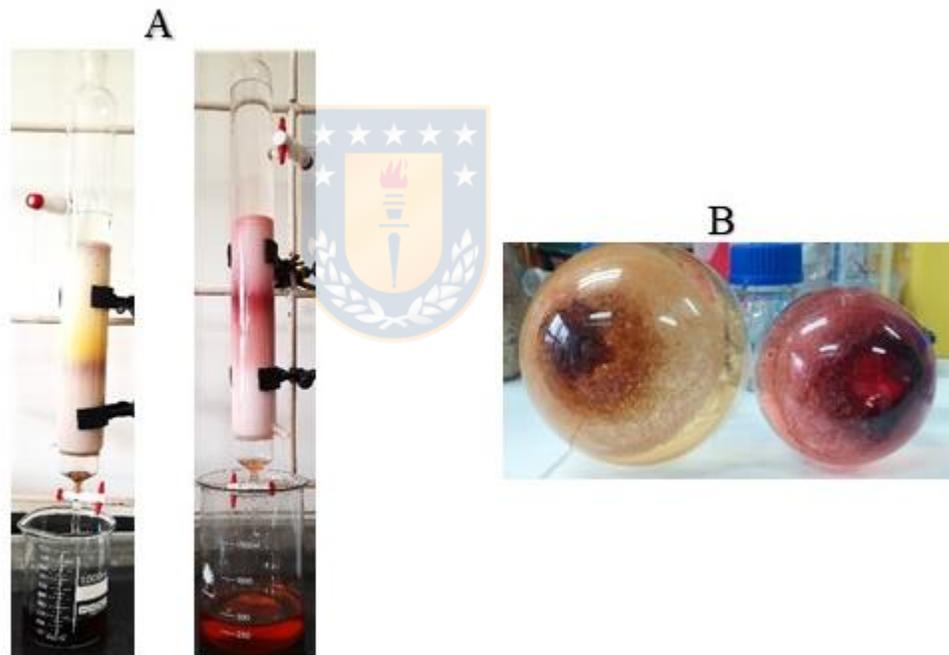
1462

1463

1464

1465 *Ilustración 14* (A) Extractos fúngicos purificados por columna de Amberlite
1466 XAD-16; (B) Extractos secos de *P. murcianum* (café claro) y de *T. australis*
1467 (rojizo).

1468



1469 En la Tabla 7 se describen los volúmenes de solventes utilizados para lavar y
 1470 eluir los extractos y los rendimientos obtenidos en cada una de las muestras.

1471

1472 *Tabla 7 Muestras, extractos y rendimientos obtenidos al purificar con*
 1473 *amberlite XAD-16.*

Fecha de purificación	Muestra	Cantidad (mL)	Lavar con Agua (mL)	Eluir con Etanol (mL)	Extracto seco (g)	Rendimiento (mg/mL)
3-4-19	TA1	500	1000	1700	2,5	5,0
6-6-19	TA2	1150	1000	1000	4,9	4,3
24-9-19	TA3	500	500	800	1,5	3,0
5-8-20	TA4	850	1000	800	0,3	0,4
16-3-21	TA5	620	1200	750	1,9	3,1
14-5-19	PM1	350	700	700	1,5	4,3
6-6-19	PM2	1200	1000	1000	2,5	2,1
25-9-19	PM3	1000	500	300	6,2	6,2
27-7-20	PM4	900	1000	800	0,4	0,4
17-3-21	PM5	250	400	1250	1,3	5,2

1474

1475 A través de la purificación fueron separados compuestos, altamente solubles
 1476 en agua (cloruro de sodio, hierro, glucosa, etc.) presentes en los caldos

1477 fúngicos. Los solventes utilizados, en este caso son GRAS (Generally

1478 Recognized as Safe)¹, lo que entrega mayor sustentabilidad al procedimiento.

1479 Al analizar los volúmenes gastados, se observa poca homogeneidad, tanto en

1480 los volúmenes de agua con los que se lavó la muestra, como de etanol

1481 utilizados para la elusión de la muestra propiamente tal. Es decir que, para
1482 una misma cantidad de muestra, existen distintos volúmenes de solventes
1483 utilizados, entre una muestra y otra. Esto puede deberse a que la
1484 concentración y los tipos de pigmentos producidos podrían variar según la
1485 composición del medio de cultivo, condiciones y tiempo de almacenamiento,
1486 entre otros. Por lo que, se dificulta la estandarización de la materia prima. Sin
1487 embargo, a través de esta esta técnica de purificación en columna con
1488 amberlita se obtuvieron extractos brutos más puros, asegurando con esto la
1489 separación de sustancias que pudieran interferir en los análisis posteriores.
1490 Además, esta técnica corresponde a un procedimiento relativamente sencillo
1491 y fácil de escalar si fuera requerido para una producción industrial.

1492

1493 **3. Fraccionamiento por Cromatografía de Partición Centrifuga (CPC).**

1494 El trabajo con extractos de origen natural es complejo, debido a que por lo
1495 general contienen múltiple cantidad de compuestos, requiriendo un proceso
1496 de fraccionamiento previo al análisis químico⁸⁴. Dentro de este contexto, la
1497 CPC ocupada en este trabajo, es una estrategia, que permite una separación
1498 eficiente de compuestos y sin utilizar grandes volúmenes de solventes.
1499 Además, los solventes utilizados en las fases móvil y estacionaria fueron

1500 reciclados varias veces antes del descarte. También, se obtiene una mayor
1501 cantidad de fracción que la separación por HPTLC, permitiendo más muestra
1502 disponible para análisis posteriores. Es por esto, que en este trabajo se utilizó
1503 la CPC como una herramienta para facilitar el análisis químico
1504 principalmente, y no se pensó como una etapa del escalamiento industrial
1505 para un producto cosmético. Aunque si se requiriera, este escalamiento
1506 podría ser directo, optimizando el fraccionamiento en el equipo de mayor
1507 capacidad de carga. A continuación, se describen los resultados del
1508 fraccionamiento por CPC para cada especie por separado.

1509

1510 **a. Fraccionamiento por CPC para extractos de *P. murcianum*.**

1511 Se definió un sistema de fases según la distribución de los pigmentos
1512 coloreados del extracto en los solventes evaluados. En el caso de la muestra
1513 PM1, la mejor combinación fue acetato de etilo / butanol / agua en proporción
1514 1 / 1 / 2 v / v /v. En cambio, el sistema de fases hexano / acetato de etilo /
1515 metanol / agua 1 / 5 / 1 / 5 v / v / v / v, no logró una distribución de pigmentos
1516 adecuada como se observa en la Ilustración 15.

1517

1518

1519

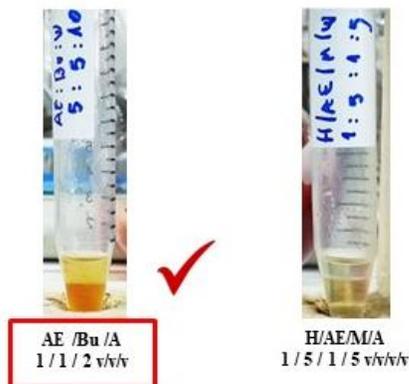
1520

1521

1522

1523

1524



1525

1526

1527

1528

1529

1530

1531

1532

1533

1534

1535

*Ilustración 15 Prueba cualitativa para selección del sistema de fases en fraccionamiento de extracto de *P. murcianum* (PM1). AE=acetato de etilo, Bu=butanol, A=agua, H=hexano, M=metanol.*

En esta sección solo fueron evaluadas las muestras PM1, PM2 y PM3, que corresponde a los primeros caldos suministrados. Las muestras PM4 y PM5, fueron utilizadas para el desarrollo de los microencapsulados.

La información de los fraccionamientos de las muestras PM1, PM2 y PM3, se describe en la Tabla 8, donde se detallan los parámetros del equipo y del proceso realizado.

1536 *Tabla 8 Condiciones obtenidas para las separaciones de las muestras PM1,*
 1537 *PM2 y PM3 en equipo de contracorriente.*

Extractos	PM1	PM2	PM3
Equipo	CPC-250	CPC-250	TMB-500
Flujo	24 mL/min	24 mL/min	25 y 50 mL/min
Rotor	2200	2200	1800
Presión alcanzada	218 psi	218 psi	400 psi
Retención columna	81%	80%	82%
Extrusión	25 min	25 min	15 min
Duración total	37 min	44min	35 min
Fracciones obtenidas	36	44	64

1538

1539 Se observa un flujo mayor en el equipo TMB, debido a que presenta un mayor
 1540 volumen de carga. Sin embargo, el rotor es más eficiente, pero la presión
 1541 alcanzada es mayor. La retención de la columna es mayor al 80% en los tres
 1542 casos, lo que es muy eficiente. Los otros parámetros son similares para los 3
 1543 casos, salvo el número de fracciones que resulta mayor en la separación en
 1544 equipo TMB. Durante el desarrollo del fraccionamiento por contracorriente,
 1545 el software entregó una señal cromatográfica para las muestras PM1, PM2 y
 1546 PM3, como se observa en la Ilustración 16.

1547

1548

1549

1550

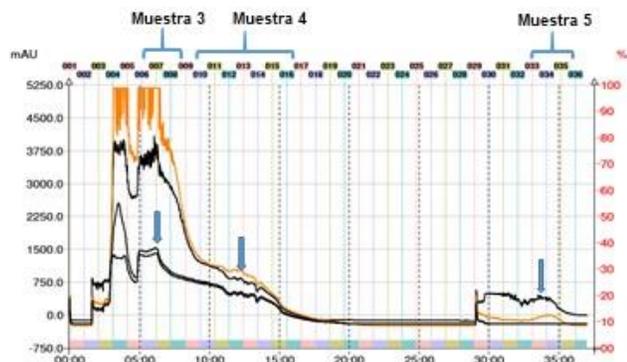
1551

1552

A

1553

1554



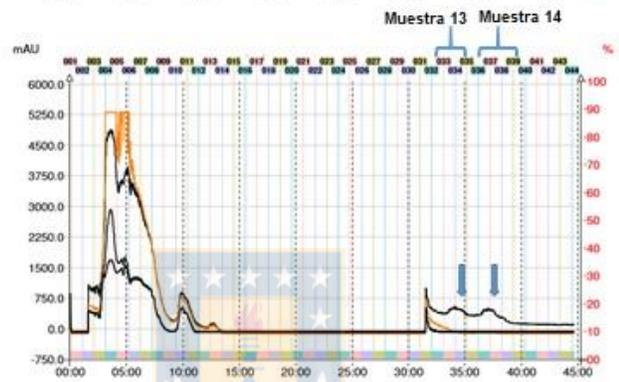
1555

1556

B

1557

1558



1559

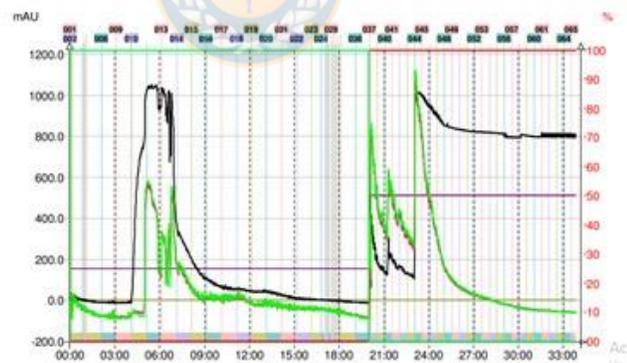
1560

1561

C

1562

1563



1564

Ilustración 16 Cromatogramas de partición centrifuga para (A) PM1; (B) PM2; (C) PM3. En azul se señalan algunas muestras de interés.

1566

1567 Los cromatogramas son similares entre sí, y están caracterizados por dos

1568 grandes señales. La primera fracción correspondería a los compuestos más

1569 polares y la segunda fracción correspondería a los compuestos menos polares
1570 obtenidos por la extrusión de la columna. Las líneas de detección de los
1571 cromatogramas A y B tienen una señal alta en la primera parte del proceso.
1572 Esto corresponde a la línea de detección general entre 200-600 nm y la línea
1573 a 254 nm, pudiendo indicar la presencia de una gran cantidad de compuestos
1574 que absorben en la región UV. La porción final de los cromatogramas A y B
1575 muestra señales más pequeñas, predominando compuestos que absorben en
1576 la región visible, representados por las líneas de detección a 420 y 520 nm.
1577 El cromatograma C, corresponde a una prueba en equipo TMB, la cual
1578 presenta ventajas en la separación de los pigmentos, ya que se observa una
1579 mejor separación en el cromatograma.

1580 En la Ilustración 17 se observan los tubos de ensayos que corresponden a
1581 cada fracción obtenida luego de la separación por CPC para PM1, PM2 y
1582 PM3.

1583

1584

1585

1586

1587

1588

A

1589

1590

1591



1592



1593

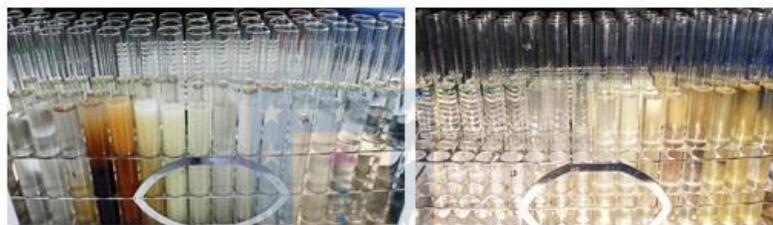
B

1594

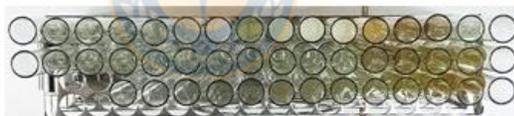
1595

1596

1597



1598



1599

C

1600

1601



1602 *Ilustración 17 Gradillas con tubos donde se colectaron las fracciones de (A)*

1603 *PM1; (B) PM2; (C) PM3.*

1604

1605 Al analizar las fracciones que se muestran en la imagen anterior, se observa

1606 que la muestra PM1 presenta una notoria separación de pigmentos amarillos

1607 y marrones, en la muestra PM2 esto no es tan notorio. En la muestra PM3,
1608 Se obtienen nuevas coloraciones que podrían ser otros pigmentos, además se
1609 obtuvieron más fracciones en un menor tiempo.

1610 En la Tabla 9 se presentan las fracciones de PM1 y PM2, a las que se les
1611 asignó un número de muestra. Esta nomenclatura fue utilizada para reconocer
1612 y fueron utilizadas en los análisis químicos posteriores.

1613

1614 *Tabla 9 Fracciones para análisis químico obtenidas en la separación de las*
1615 *muestras de PM1 y PM2.*



Muestra	Descripción
1	Extracto Total (ET)
2	Fracción 1-5
3	Fracción 6-8 PM1
4	Fracción 9-16 PM1
5	Fracción 33-36 PM1
6	Fracción 3 PM2
7	Fracción 4 PM2
8	Fracción 5 PM2
9	Fracción 6 PM2
10	Fracción 7-8 PM2
11	Fracción 9-14 PM2
12	Fracción 15-30 PM2
13	Fracción 32-35 PM2
14	Fracción 36-39 PM2
15	Fracción 40-44 PM2

1616

1617 Las fracciones de PM3 no se describen en la Tabla 8, esto porque no se
1618 realizaron análisis químico y/o de propiedad antioxidante. La muestra PM3
1619 solo se utilizó para ensayos preliminares en equipo TMB.

1620 De esta forma, se obtuvieron por fraccionamiento con contracorriente,
1621 fracciones relativamente puras de la especie *P. murcianum*.

1622

1623 **b. Fraccionamiento por CPC para extractos de *T. australis* con sistema**
1624 **de fases 1.**

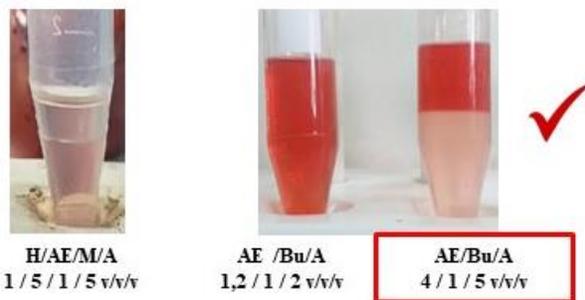
1625 En este caso, se definió un sistema de fases en base a la distribución de los
1626 pigmentos en una mezcla de solventes. Esta distribución se observa en la
1627 Ilustración 18.

1628

1629

1630

1631



1632

1633

1634

1635

Ilustración 18 Prueba cualitativa para selección de sistema de fases para fraccionamiento del extracto de *T. australis* (TA1). H=hexano, AE=acetato de etilo, M=metanol, Bu=butanol.

1636 A través de la prueba cualitativa se visualiza que para la muestra TA1, la
 1637 mejor combinación fue acetato de etilo / butanol / agua 4 / 1 / 5 v / v / v. Se
 1638 descartaron los sistemas de fases hexano / acetato de etilo / metanol / agua 1
 1639 / 5 / 1 / 5 v / v / v / v y acetato de etilo / butanol / agua 1,2 / 1 / 2 v / v / v.

1640 En esta sección solo fueron evaluadas las muestras TA1, TA2, TA3 y parte
 1641 de TA4. Una parte de la muestra TA4 y TA5, fueron utilizadas para el
 1642 desarrollo de los microencapsulados.

1643 Se realizaron dos separaciones por CPC con las muestras TA1 y TA2 y el
 1644 sistema de solventes seleccionado. Los datos obtenidos en ambos
 1645 fraccionamientos se agrupan en la Tabla 10.

1646
 1647 *Tabla 10 Condiciones obtenidas para las separaciones de las muestras TA1*
 1648 *y TA2.*

Extractos	TA1	TA2
Equipo	CPC-250	CPC-250
Flujo	12 y 30 mL/min	24 mL/min
Rotor	1800	2000
Presión alcanzada	218 psi	218 psi
Retención columna	81%	81%
Extrusión	47 min	35 min
Duración total	60 min	52 min
Fraciones obtenidas	50	39

1649

1650 Se observa que las condiciones alcanzadas durante el desarrollo de las
1651 separaciones son bastante similares entre TA1 y TA2.

1652 En la Ilustración 19 se observan los cromatogramas para TA1 y TA2, con las
1653 distintas líneas de detección utilizadas.

1654

1655

1656

1657

1658

1659

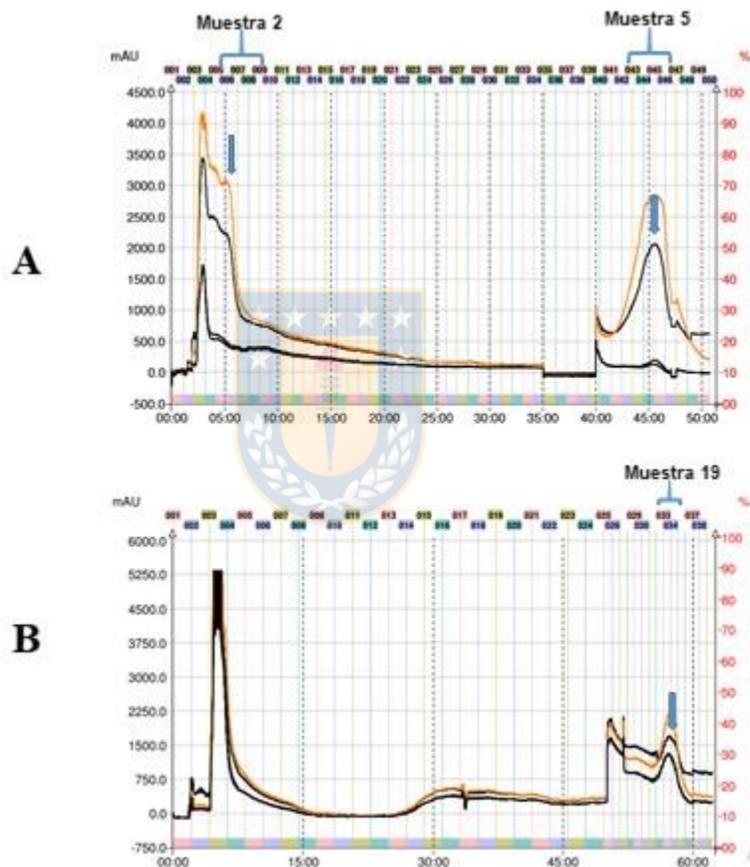
1660

1661

1662

1663

1664



1665 *Ilustración 19* Cromatogramas de partición centrífuga para (A) TA1; (B) TA2.

1666 *En azul se señalan las muestras de interés.*

1667

1668 En el caso de los cromatogramas desarrollados, estos son bastantes similares
1669 entre sí. Se observan dos regiones principales, la primera correspondiente a
1670 los compuestos más polares y la segunda a los compuestos menos polares.
1671 En los cromatogramas de ambas muestras se observa una señal alta antes de
1672 los 6 minutos del desarrollo del proceso. En el caso del cromatograma A,
1673 tanto la línea de detección entre 200-600 nm, como las líneas específicas a
1674 254, 420 y 510 nm presentan casi la misma proporción. Esto indicaría una
1675 gran presencia de compuestos que absorben tanto al UV como al visible. En
1676 la última porción del cromatograma, que corresponde a los compuestos que
1677 salen por extrusión, se ve una señal menor, aunque equilibrada en proporción
1678 a las distintas líneas. En el caso del cromatograma B se observa una mayor
1679 proporción de compuestos que absorben al UV, en relación a los que
1680 absorben al visible tanto para la primera y segunda región del cromatograma.
1681 En la ilustración 20 se observan los tubos de ensayos obtenidos luego de la
1682 separación por CPC para TA1 y TA2.

1683

1684

1685

1686

1687

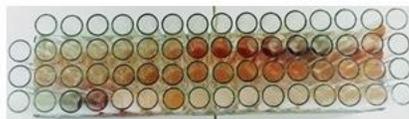
A

1688

1689



1690



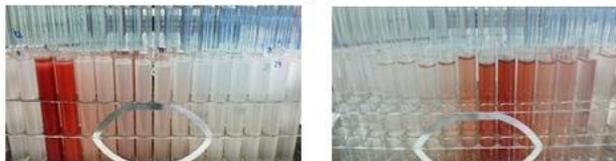
1691

1692

B

1693

1694



1695



1696

Ilustración 20 Gradillas con tubos donde se colectaron las fracciones de (A)

1697

TA1; (B) TA2.

1698

1699 En el caso de TA1 se presenta una mejor separación de las fracciones, ya que

1700 se obtuvieron más y distintas tonalidades, que van desde los amarillos a los

1701 tonos más rojizos. Esta ventaja pudo deberse a que se utilizaron dos flujos

1702 distintos durante el fraccionamiento, uno durante el fraccionamiento y otro

1703 durante la extrusión. Cada tubo fue analizado de manera preliminar a través

1704 de HPLC, y se seleccionaron las fracciones que presentaban dentro de su

1705 cromatograma, picos más abundantes y puros. A través de estos ensayos se

1706 pudo notar la presencia de diversos pigmentos en las muestras, los cuales, al
1707 presentar características fisicoquímicas similares, son difíciles de separar.
1708 Por esta razón, en el caso de los extractos de *T. australis* se evaluó otro
1709 sistema de solventes, el cual se describe a continuación.

1710

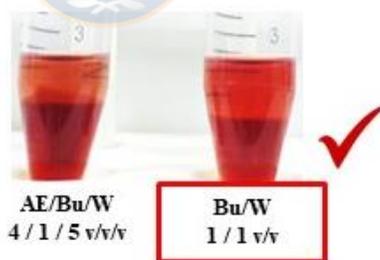
1711 **c. Fraccionamiento por CPC para extractos de *T. australis* con sistema**
1712 **de solventes 2.**

1713 Se definió un nuevo sistema de fases, en base a una distribución más óptima
1714 de los pigmentos en un sistema de solvente, lo que se observa en la Ilustración
1715 21.

1716

1717

1718



1719

1720 *Ilustración 21 Prueba cualitativa para comparación de la distribución de los*
1721 *pigmentos entre dos sistemas bifásicos en fraccionamiento de muestra de *T.**
1722 *australis (TA3).*

1723 En este caso, el sistema bifásico de butanol / agua en proporción 1 / 1 v / v
1724 presenta una mejor distribución de los pigmentos que acetato de etilo /

1725 butanol / agua en proporción 4 / 1 / 5 v / v /v. A partir de esto, se realizó una
1726 nueva separación en el equipo TMB, el cual permite la inyección de un mayor
1727 volumen de muestra. La información obtenida de los fraccionamientos se
1728 agrupa en la Tabla 11.

1729

1730 *Tabla 11 Información obtenida de la CPC para las muestras TA3 y TA4.*

Extractos	TA3	TA4
Equipo	TMB-500	TMB-500
Flujo	25 y 50 mL/min	25 y 50 mL/min
Rotor	2000	2000
Presión alcanzada	400 psi	400 psi
Retención columna	74%	78%
Extrusión	33 min	33 min
Duración total	48 min	46 min
Fracciones obtenidas	64	71

1731

1732 En este caso, ambos fraccionamientos para las muestras TA3 y TA4 son
1733 bastantes similares entre sí. Las diferencias más notorias, son con los
1734 fraccionamientos con el sistema de fase 1, donde se utilizó el CPC-250. Para
1735 el sistema de fase 2 se utilizó el equipo TMB-500 que presenta una mayor
1736 capacidad de carga de la muestra, lo que influyó en un flujo aumentado al
1737 doble, sin aumentar el rotor, pero si la presión alcanzada. Con respecto a la
1738 retención de la columna, esta disminuyó al obtenerse sobre un 74% a
1739 diferencia del primer caso cuyos valores fueron sobre el 80%. La duración

1740 del proceso disminuyó con el sistema de fase 2, donde se obtuvieron más
1741 fracciones, pudiendo indicar un fraccionamiento más eficiente.
1742 Durante el transcurso de la cromatografía de partición centrífuga, el software
1743 entregó una señal cromatográfica, como se observa en la Ilustración 22.

1744

1745

1746

1747

1748

1749

1750

1751

1752

1753

1754

1755

1756

1757

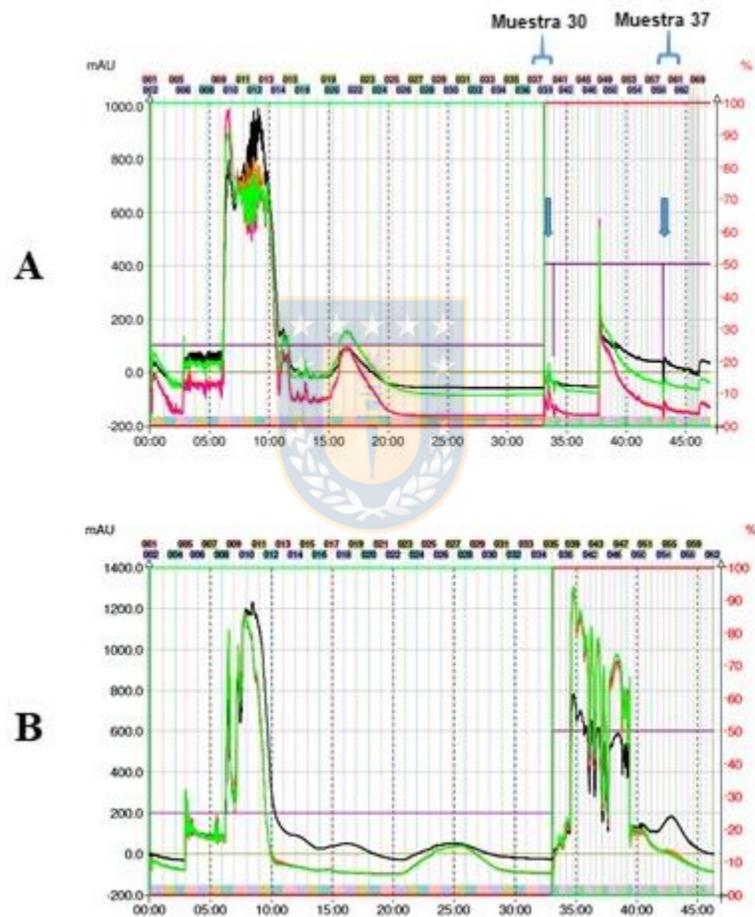
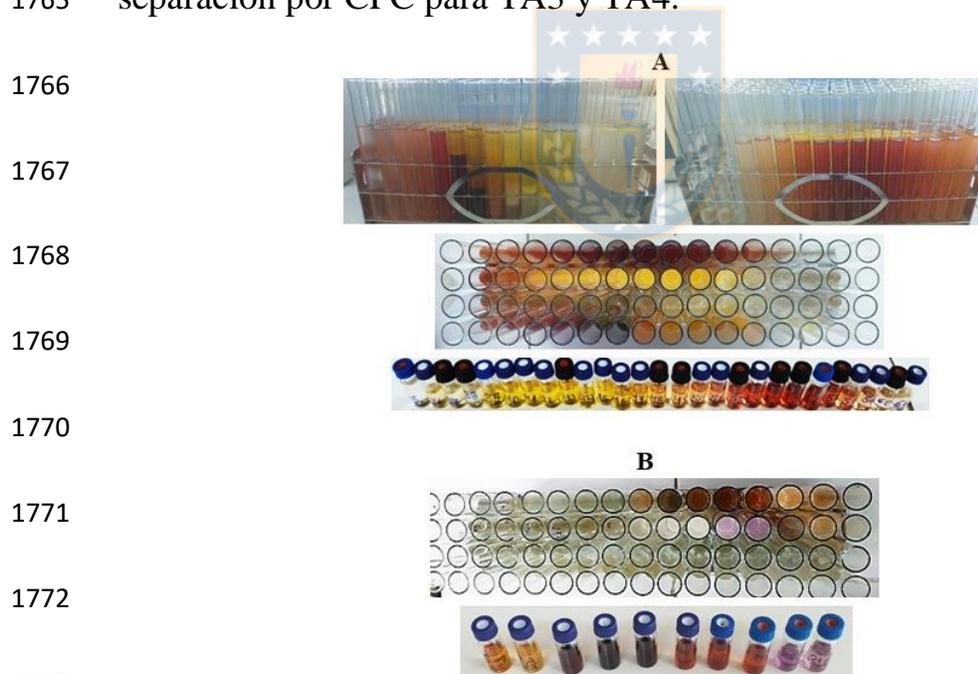


Ilustración 22 Cromatogramas de partición centrífuga para las muestras
(A) TA3; (B) TA4. En azul se señalan algunas muestras de interés.

1758 A partir de los cromatogramas se observa una mejor separación de las señales
1759 obtenidas en los fraccionamientos con el sistema de fase 2 y el equipo TMB.
1760 Esto, porque ya no se observan solo dos fracciones principales, como en los
1761 cromatogramas obtenidos con el sistema de fase 1, sino que además se
1762 observan fracciones intermedias y una mejor definición de los picos
1763 obtenidos.

1764 En la Ilustración 23 se observan los tubos de ensayos obtenidos luego de la
1765 separación por CPC para TA3 y TA4.



1774 *Ilustración 23 (A) Gradilla con tubos con fracciones de TA3 y algunos*
1775 *viales analizados; (B) Gradilla con tubos donde se colectaron fracciones*
1776 *de TA4 y viales seleccionados.*

1777

1778 En este caso hay una clara visualización de tonalidades de pigmentos que
1779 no se habían observado con el sistema de solventes 1. Lo que indicaría un
1780 mejor fraccionamiento de las muestras.

1781 Después de cada separación, se analizaron de manera preliminar por HPLC-
1782 UV y se seleccionaron las fracciones a las que se les asignó un número de
1783 muestra cómo se detalla en la Tabla 12.

1784

1785 *Tabla 12 Fracciones obtenidas en la separación de las muestras de TA1, TA2*
1786 *y TA3.*



Muestra	Descripción
1	Extracto Total (ET)
2	Fracción 5-10 TA1
3	Fracción 11-18 TA1
4	Fracción 29-31 TA1
5	Fracción 32-38 TA1
6	Fracción 3 TA2
7	Fracción 4 TA2
8	Fracción 5 TA2
9	Fracción 6 TA2
10	Fracción 7-8 TA2
11	Fracción 9-13 TA2
12	Fracción 14-16 TA2
13	Fracción 17-19 TA2
14	Fracción 20 TA2
15	Fracción 21-22 TA2
16	Fracción 23 TA2
17	Fracción 24-26 TA2
18	Fracción 27-30 TA2

19	Fracción 31-32 TA2
20	Fracción 33-34 TA2
21	Fracción 35 TA2
22	Fracción 37-39 TA2
23	Fracción 8-9 TA3
24	Fracción 10-11 TA3
25	Fracción 12 TA3
26	Fracción 13-16 TA3
27	Fracción 17-25 TA3
28	Fracción 26-27 TA3
29	Fracción 28-34 TA3
30	Fracción 35-38 TA3
31	Fracción 39-44 TA3
32	Fracción 45-46 TA3
33	Fracción 47-50 TA3
34	Fracción 51-52 TA3
35	Fracción 53-54 TA3
36	Fracción 55-57 TA3
37	Fracción 58-59 TA3
38	Fracción 60-61 TA3
39	Fracción sangrado 1 TA3
40	Fracción sangrado 2 TA3
41	Fracción 43 TA3

1787

1788 En la Tabla 12 no se describen las fracciones de TA4 ni de TA5, esto debido
 1789 a que esas muestras fueron utilizadas para realizar los microencapsulados y
 1790 no para la caracterización química y antioxidante.

1791 En ambas especies evaluadas las retenciones de fase estacionaria fueron
 1792 elevadas (50-85%), lo que respalda la eficiencia del método. La capacidad de
 1793 carga hace que esta técnica sea ideal para procesos preparativos que
 1794 involucran muestras muy complejas. La CPC es además una técnica versátil,
 1795 mucho más rápida y con mayor ahorro de solventes que otros métodos

1796 tradicionales⁸⁵. Finalmente, una ventaja adicional de la CPC es que el
1797 escalamiento para su aplicación industrial en purificación de extractos
1798 naturales, es directo⁸⁶. Aunque este no es el objetivo de la presente
1799 investigación, ya que, en este caso el fraccionamiento por CPC se utiliza solo
1800 para fines investigativos de la caracterización química de los pigmentos.

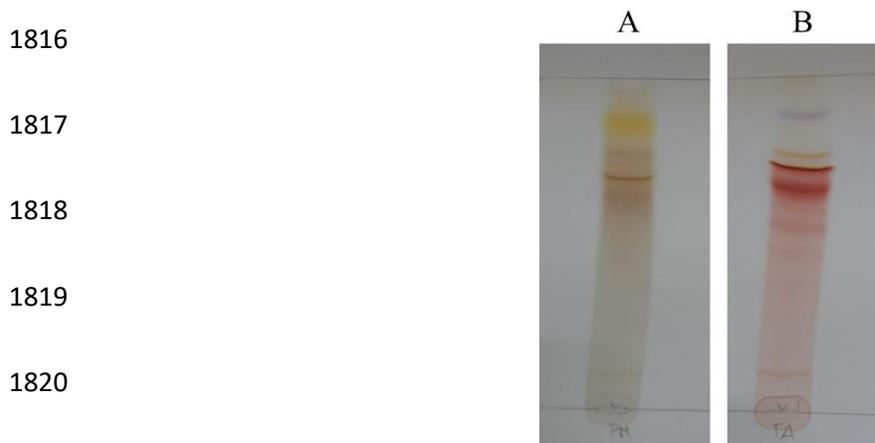
1801 Luego de la separación por contracorriente, se seleccionaron las fracciones
1802 que presentaban los pigmentos más abundantes y puros, a través de un
1803 análisis preliminar de las muestras con HPLC-UV. A partir de estas muestras
1804 se realizaron los análisis químicos y de propiedad antioxidante.

1805

1806 **4. Análisis por cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC).**

1807 Otra técnica de separación de pigmentos es la cromatografía de capa fina, la
1808 cual es muy útil cuando se trabaja con mezclas complejas⁷². Con el fin de
1809 conocer la pureza de las fracciones obtenidas y la polaridad de las muestras,
1810 se evaluaron por HPTLC extractos brutos y fracciones de *P. murcianum* y *T.*
1811 *australis*. Una ventaja de este método, es que se trabaja con cantidades
1812 pequeñas de muestras y, por lo tanto, se utilizan volúmenes menores de
1813 solventes.

1814 En la Ilustración 24 se muestran los resultados de las cromatografías de capa
1815 fina de los extractos brutos de ambas especies fotografiadas con luz visible.



1821

1822 *Ilustración 24* Placas sembradas con (A) Extracto total de *P. murcianum*; (B)
1823 Extracto total de *T. australis*. FM = acetonitrilo : agua : ácido fórmico (8,0:
1824 1,9:0,1).

1825

1826 Las fracciones fueron sembradas en placa de sílica y luego fueron eluídas con
1827 sistemas de solventes de distinta polaridad. Los resultados fotografiados con
1828 luz visible se observan en la Ilustración 25.

1829

1830

1831

1832

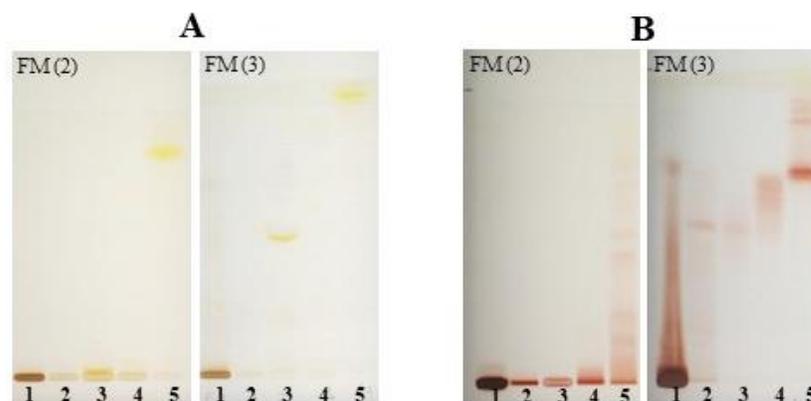
1833

1834

1835

1836

1837



1838

1839

1840

1841

1842

1843

1844 Se visualiza una menor cantidad de pigmentos amarillos en las muestras de

1845 *P. murcianum*, lo que indicaría fracciones más puras. En el caso de *T.*

1846 *australis* se observan fracciones menos puras con gran cantidad de pigmentos

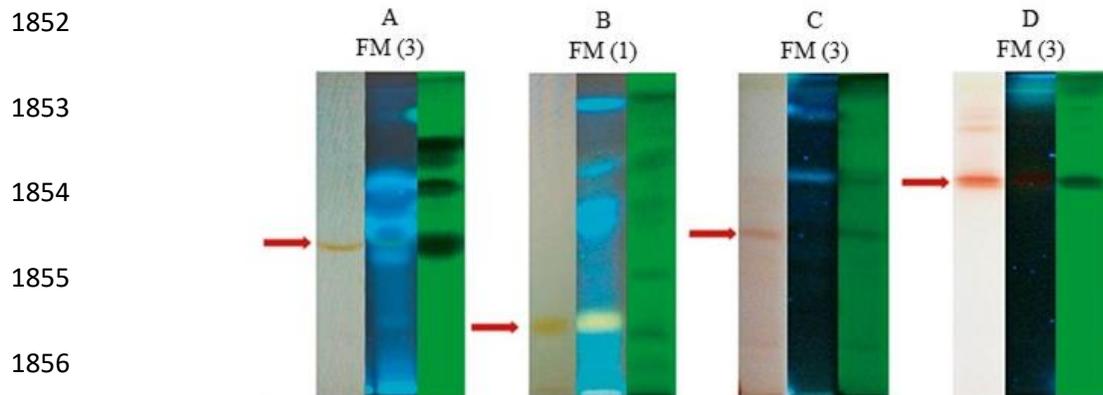
1847 rojos. Las placas también fueron visualizadas y fotografiadas con luz

1848 fluorescente y ultravioleta como se observa en la Ilustración 26.

1849

1850

1851



1857

Ilustración 26 Placas de izq. a der. con luz visible, fluorescente y ultravioleta; (A) Muestra 3 y (B) Muestra 5 de *P. murcianum*; (C) Muestra 2 y (D) Muestra 5 de *T. australis*. FM (1)= H / AE / AF (24 / 18 / 1); FM (3)= ACN / A / AF (8,0 / 1,9 / 0,1).

1861

1862 En las muestras 3 y 5 de *P. murcianum*, se visualizan pocos pigmentos
 1863 amarillos, pero con luz fluorescente se observan más compuestos. Además,
 1864 se observa que los pigmentos coloreados fluorescen y con luz ultravioleta se
 1865 revelan otros compuestos presentes en las muestras. Para las muestras 2 y 5
 1866 de *T. australis* se observan varios pigmentos rojos, lo que indica la dificultad
 1867 en el fraccionamiento de éstas. Sin embargo, en este caso, se observa una
 1868 cantidad similar de pigmentos, tanto con luz fluorescente como ultravioleta.
 1869 Este análisis evidenció la gran complejidad química de las fracciones
 1870 obtenidas. Además de pigmentos coloreados, existirían otro tipo de

1871 metabolitos, que no son revelados con luz visible, pero que se encuentran en
1872 gran proporción con respecto a los pigmentos coloreados. Este tipo de
1873 compuesto también podría estar relacionado al efecto antioxidante u otras
1874 actividades biológicas de interés. Por lo que, se propone a futuro hacer
1875 análisis de las distintas manchas obtenidas por el HPTLC, y a partir de estas,
1876 hacer el análisis en UHPLC-DAD-MS.

1877

1878 **5. Análisis de fracciones por cromatografía líquida de ultra alta**
1879 **eficiencia (UHPLC) con un detector de arreglo de diodos (DAD) y**
1880 **espectrometría de masas en tándem (MS y MS-MS).**

1881 La espectrometría de masas se ha vuelto cada vez más accesible y necesaria
1882 a la hora de realizar un análisis químico en nuevas fuentes de metabolitos
1883 secundarios⁸⁷. Es por esto, que en el presente trabajo se realizaron ensayos
1884 preliminares, con el fin de contribuir a dilucidar la estructura de los
1885 pigmentos detectados. A continuación, se describen los resultados para las
1886 dos especies estudiadas:

1887

1888

1889

1890 **a. Análisis de fracciones de *P. murcianum* por UHPLC-DAD-MS**

1891 En este caso, a través de los análisis cromatográficos, se logró establecer que
 1892 se obtuvieron fracciones relativamente puras, lo que permitió un mejor
 1893 análisis químico. Los análisis se realizaron sobre las cuatro fracciones más
 1894 puras logradas con CPC para la muestra PM1. Se detectaron múltiples
 1895 pigmentos amarillos, naranjos, rojos y marrones con valores de m/z que
 1896 coinciden con los valores de peso molecular reportados en pigmentos
 1897 naturales conocidos. La mayor parte corresponde a policétidos, azafilonas y
 1898 antraquinoides^{36,88}. En la Tabla 13 se reúne la información de pigmentos
 1899 conocidos que podrían estar presente en el extracto de *P. murcianum*.

1900
 1901 *Tabla 13 Datos obtenidos a partir de los espectros de masa en modo scan*
 1902 *para las muestras de P. murcianum.*

Muestra	t_R (min) F: 1,0 (MS)	t_R (min) F: 0,6 (MS-MS)	DAD λ (nm)	m/z	PM (g/mol)	Identificación tentativa/color
2	16,05	-	735, 752, 770	514,25	515	N- glucosylrubropuncta mine ⁸⁹
3	6,45	7.62	311, 369, 398, 446	411,15	412	1,4-Monaphilol D ⁹⁰ (S)-Mitorubrinic acid ⁹¹
				421,15	358	Monascin ⁹² (HCOOH+H ₂ O) Rubropunctin ³⁰
	7,85	-	406, 431, 484, 589	267,00	268	Nordamnacanthal (2-formyl-1,3-

						dihydroxy – anthraquinone) ⁸⁸
				239,00	240	Alizarin (1,2-dihydroxy-anthraquinone) ⁸⁸
						Anthraflavic acid (= anthraflavin) (2,6-dihydroxy-anthraquinone) ⁸⁸
						Danthron (chryszin) (1,8-dihydroxy-anthraquinone) ⁸⁸
						Xanthopurpurin (1,3-dihydroxy-anthraquinone) ⁸⁸
						Quinizarin (1,4-dihydroxy-anthraquinone) ⁸⁸
4	17,03	-	273, 318, 361, 378, 426	319,19	320	Monashexenone ⁹³
				323,15	324	Sterigmatocystin (3a,12c-Dihydro-8-hydroxy-6-methoxy-7H-furo(3',2':4,5)furo(2,3-c)xanthen-7-one) ⁹⁴
				355,15	356	Monankarin E ⁹⁵
				382,10	383	Monaphilol B ⁹⁵
						Monaphilol A ⁹⁵
						Monascorubrin ⁹⁶
		17,02	-	273, 318, 361, 426	313,12	314
						Endocrocin (3-methyl-1,6,8-trihydroxy-anthraquinone-2-carboxylic acid) ⁸⁸
						Flavokermesic acid (1-methyl-3,6,8-trihydroxy-anthraquinone-2-carboxylic acid) ⁸⁸
5	11,42	12,00	277, 313, 407	319,10	320	Monashexenone ⁹³

1904 Se seleccionaron las muestras 3 y 5 para análisis MS-MS, debido a que
1905 presentaron una mejor separación de las señales obtenidas por HPLC. De esta
1906 forma se simplifica la interpretación de los valores de masa y los resultados
1907 se acercan más a las estructuras químicas de los pigmentos principales. Por
1908 lo tanto, se comenzará con el análisis de la muestra 3 de *P. murcianum*.

1909

1910 • **Análisis de la muestra 3 de *P. murcianum* por UHPLC-DAD-MS-**
1911 **MS.**

1912 La señal del pigmento principal obtenida desde el cromatograma presenta un
1913 máximo a un t_R de 7,617 min como se observa en la Ilustración 27.

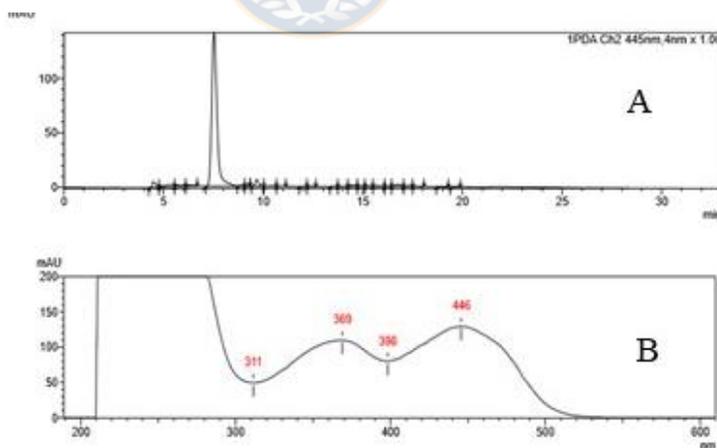
1914

1915

1916

1917

1918



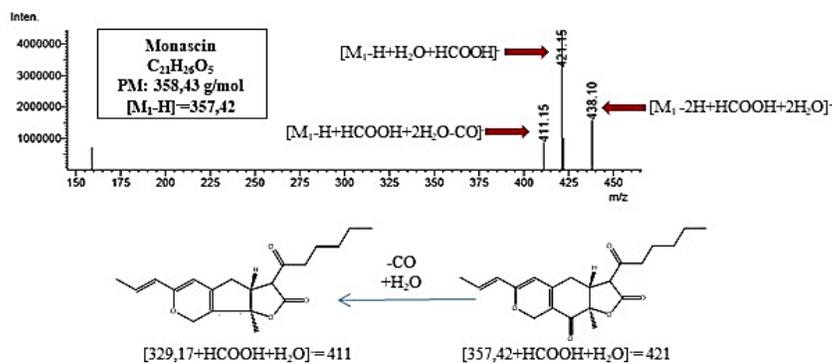
1919

*Ilustración 27 (A) Cromatograma UHPLC; (B) Espectrograma de 200-600 nm para la señal principal registrada en un $t_R = 7,617$ min en la muestra 3 de *P. murcianum*.*

1922

1923 La señal mayoritaria que se observa en el cromatograma a un t_R 7,62 min y
 1924 una λ de 445 nm, indican absorción en la región del visible. El espectrograma
 1925 UV-VIS muestra máximos mayoritarios en la región UV. En la región UV-
 1926 fluorescente hay dos máximos a 311 y 369 nm, y en la región del visible se
 1927 observan dos máximos a los 398 y 446 nm. Estos valores son característicos
 1928 para pigmentos fluorescentes, amarillos y naranjos. Esta información
 1929 coincide con el resultado obtenido en HPTLC, donde se observa para esta
 1930 muestra, el pigmento amarillo fluorescente.

1931 En la Ilustración 28^{36,92,97,98} se describen los espectros ESI-MS en modo scan,
 1932 los que entregan valores de masa que corresponderían a iones moleculares de
 1933 los pigmentos mayoritarios de la muestra.



1934
 1935
 1936
 1937 *Ilustración 28* Espectro de masas y estructura química de compuesto
 1938 principal en la muestra 3 de *P. murcianum*.
 1939
 1940

1941 Es necesario considerar que los valores pueden contener aductos con ácido
1942 fórmico (HCOOH) y agua, principalmente, debido a la alta afinidad que
1943 presentaría la muestra con las fases móviles utilizadas, considerando que en
1944 este caso se está investigando un pigmento más polar.

1945 Al realizar una búsqueda bibliográfica de los pesos moleculares de pigmentos
1946 naturales conocidos y comparar con los m/z obtenidos, se selecciona el ion
1947 molecular principal $[M_1-H]= 421,15$. Dicho valor coincide con el pigmento
1948 amarillo monascin $C_{21}H_{26}O_5$ (PM=358,43 g/mol)⁹², que correspondería al ión
1949 molecular 357 formando un aducto con HCOOH y H₂O, sumando un valor
1950 de masa de 421. El valor 411,15 correspondería al compuesto monascin sin
1951 un grupo carbonilo y formando aducto con HCOOH y dos moléculas de H₂O.
1952 El valor 438,10 sería el ión molecular de monascin formando aducto con
1953 HCOOH, dos moléculas de H₂O y con pérdida de un H⁺. Existen antecedentes
1954 que respaldan esto, según Mapari *et al.* (2008)⁹², monascin (M₁) forma un
1955 aducto con acetonitrilo y sodio, $[M_1+Na+CH_3CN]^+=422,19$. Esto es similar
1956 a lo obtenido en el presente ensayo, pero difieren en que la formación de
1957 aductos es con HCOOH y H₂O, porque corresponderían a las fases móviles
1958 usadas. Además Yang *et al.*(2018)⁹⁹ describen la formación de un valor m/z
1959 331, con ionización positiva. Esto coincidiría con m/z 329 obtenido en este

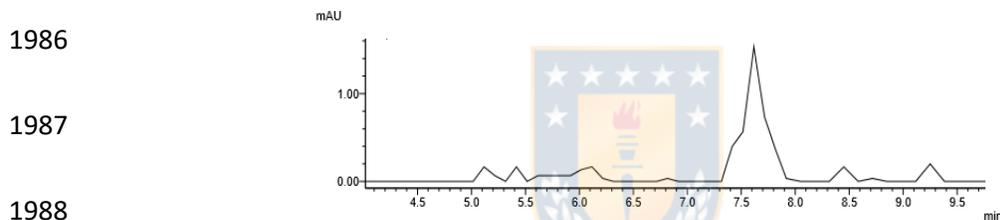
1960 análisis que al formar un aducto con HCOOH y H₂O, es detectado como *m/z*
1961 411,15 en el espectro de masa.

1962 Sin embargo, también se proponen otros pigmentos tentativos para el valor
1963 masa de 411,15, los cuales podrían ser 1,4-monaphilol D C₂₄H₂₈O₆
1964 (PM=412,48 g/mol)^{100,101} o (S)-mitorubrinic acid C₂₁H₁₆O₉ (PM=412
1965 g/mol)³⁶. Para el caso de 1,4-monaphilol D, Hsu *et al.*(2011)¹⁰⁰ describen que
1966 forma un ión molecular [M+H]⁺=413,20, el cual se relaciona al valor de masa
1967 [M-H]⁻ =411,15, cambiando solo el tipo de ionización. Según los
1968 antecedentes encontrados los máximos de absorción serían 307 y 470 nm, y
1969 lo obtenido en este ensayo fue 445 nm, esta disminución en el máximo de
1970 absorción podría deberse a la presencia de otros pigmentos que enmascaran
1971 el valor real. Por otro lado, el valor de 307 nm propuesto por Hsu *et al.*
1972 (2011)¹⁰⁰, siendo un valor cercano al 311 nm obtenido en el presente ensayo.

1973 La otra alternativa propuesta puede corresponder al pigmento amarillo
1974 mitorubrinic acid, que según Woo *et al.* (2012)⁹¹, corresponde al ión
1975 molecular [M₂+H]⁺=413,09, coincidiendo con el ión molecular [M₂-H]⁻
1976 =411,15 obtenido en el presente ensayo. En la misma muestra, también se
1977 observa un valor de masa de 239 que podría corresponder a un
1978 hidroxiantraquinoide amarillo como anthraflavic acid o alizarin, rojo como

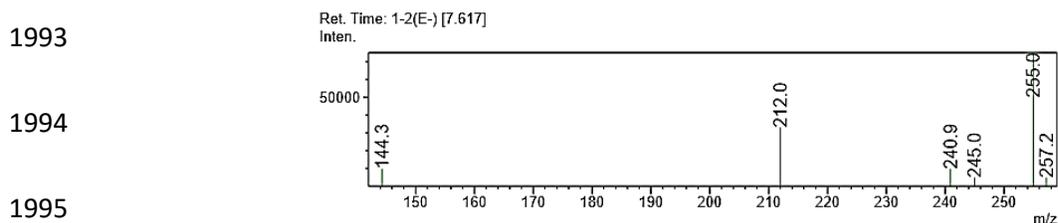
1979 danthron o xanthopurpurin, o marrón como quinizarin, todos estos
1980 compuestos presentan una formula molecular de $C_{14}H_6O_2(OH)_2$ y un
1981 $PM=240\text{ g/mol}^{88}$.

1982 Para realizar un análisis más riguroso y entregar más antecedentes que
1983 respalden los resultados se cambió a tándem MS-MS, impactando de esta
1984 forma al ión molecular 421,15 con una señal a un $t_R=7,617\text{ min}$ como se
1985 muestra en la Ilustración 29.



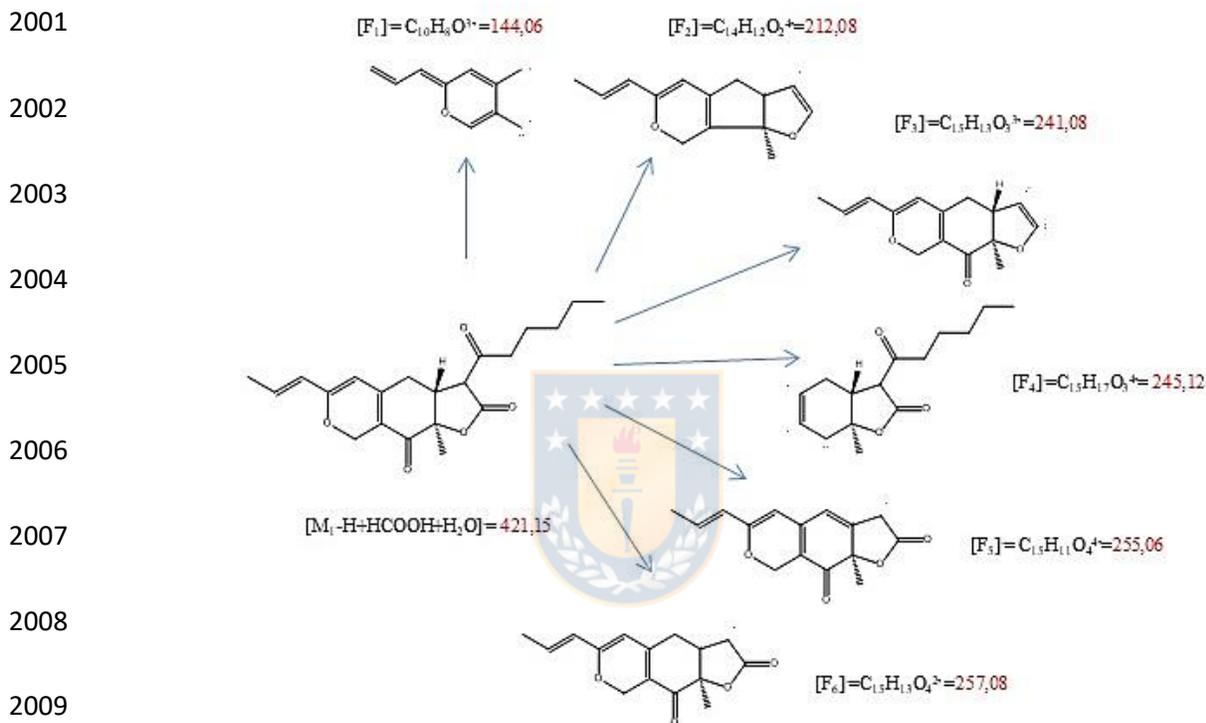
1989 *Ilustración 29 Cromatograma en tándem MS-MS para el m/z 421,15.*

1990 El espectro de MS-MS del ión 421,15 que se observa en la Ilustración 30,
1991 muestran valores m/z que corresponderían a fragmentos formados por
1992 monascin.



1996 *Ilustración 30 Espectro de masa-masa para el ión molecular 421,15 en la*
1997 *muestra 3 de *P. murcianum*.*

1998 En la Ilustración 31 se describen los distintos fragmentos que se formarían
1999 durante la ionización y que son propuestos para explicar los resultados del
2000 análisis MS-MS.



2010 *Ilustración 31* Fragmentos obtenidos desde monascin a través de
2011 ChemDraw®, para los valores m/z obtenidos en el análisis ESI (-) /MS-MS
2012 en la muestra 3 de *P. murcianum*.

2013

2014 En la Tabla 14 se comparan los resultados experimentales obtenidos del
2015 ensayo en tándem MS-MS con los valores calculados teóricamente a través
2016 del software ChemDraw®.

2017 **Tabla 14** Valores de masa teóricos y experimentales para fragmentos
2018 obtenidos por ESI-MS-MS para el ión molecular 421,15 en la muestra 3 de
2019 *P. murcianum*.

Valor masa experimental	Valor masa teórico para monascin
144,30	[F ₁] ⁻ = 144,06
212,00	[F ₂] ⁻ = 212,08
240,90	[F ₃] ⁻ = 241,08
245,00	[F ₄] ⁻ = 245,12
255,00	[F ₅] ⁻ = 255,06
257,20	[F ₆] ⁻ = 257,08

2020

2021 A partir de la información obtenida con tándem MS-MS, se entregan los
2022 valores de m/z que corresponderían a los fragmentos del ión molecular
2023 seleccionado, en este caso m/z=421,15. Con ayuda del software
2024 ChemDraw®, se proponen los fragmentos que se obtendrían desde monascin,
2025 contribuyendo a la posibilidad que este pigmento se encuentre en la muestra
2026 3 de *P. murcianum*.

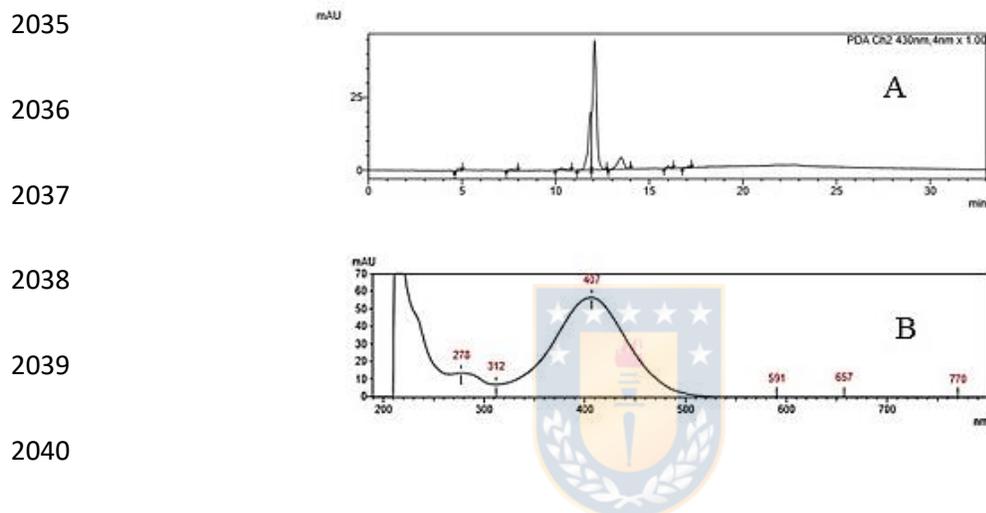
2027 El mismo procedimiento se realizó con la muestra 5 de *P. murcianum* y el
2028 detalle de esto se describe a continuación.

2029

2030

- 2031 • **Análisis de la muestra 5 de *P. murcianum* por UHPLC-DAD-MS-**
2032 **MS.**

2033 La señal del pigmento principal obtenida desde el cromatograma presenta un
2034 máximo a un t_R de 12,00 min como se observa en la Ilustración 32.

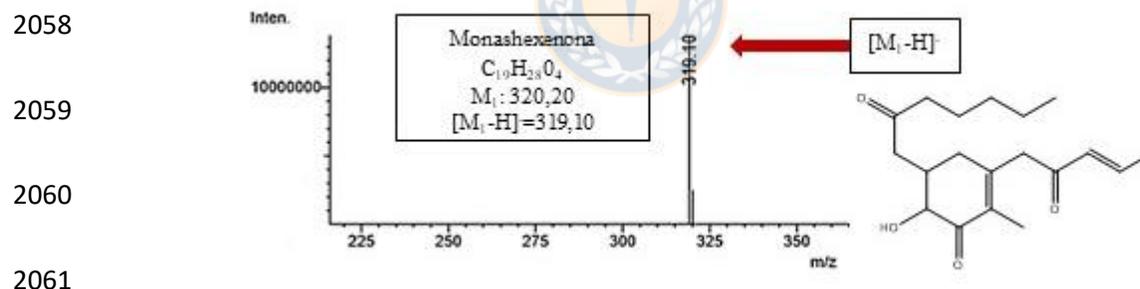


2041 *Ilustración 32 (A) Cromatograma UHPLC; (B) Espectrograma UV-VIS*
2042 *desde 200 a 800 nm para muestra 5 de *P. murcianum*.*

2043

2044 En esta muestra, la señal mayoritaria se obtiene a un t_R mayor (12,00 min)
2045 que el del pigmento de la muestra 3 (7,62 min). Esto indica que el pigmento
2046 de la muestra 5 tiene una menor polaridad con respecto al pigmento de la
2047 muestra 3, confirmando lo mismo que se había visualizado en la CPC y la
2048 HPTLC con respecto a la polaridad de los pigmentos.

2049 El espectrograma UV-VIS, muestra máximos mayoritarios en la región UV
2050 y en menor proporción, máximos de absorción en la región UV-Fluorescente
2051 a 278 y 312 nm. En la región de interés del espectro visible, se observa un
2052 máximo a los 407 nm, región característica para pigmentos amarillos.
2053 Las medidas de UHPLC-DAD-MS en modo scan revelan espectros que
2054 entregan un valor de masa de 319,10, que correspondería al ión molecular del
2055 pigmento mayoritario de la muestra 5. Este valor coincidiría con el policétido
2056 amarillo monashexenona $C_{19}H_{28}O_4$ (PM= 320,43 g/mol)⁹³, como se observa
2057 en la Ilustración 33^{93,95}.



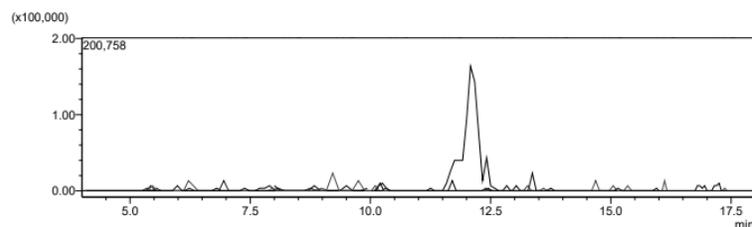
2062 **Ilustración 33** Espectro de masas modo scan y estructura química del
2063 pigmento mayoritario propuesto para la muestra 5 de *P. murcianum*.

2064

2065 Para entregar más antecedentes que respalden los resultados se cambió a
2066 tándem MS-MS, centrando el análisis en el valor m/z 319,10, seleccionado

2067 como ión molecular principal. Este presenta una señal mayoritaria a un t_R =
2068 12,00 min como se observa en la Ilustración 34.

2069
2070
2071

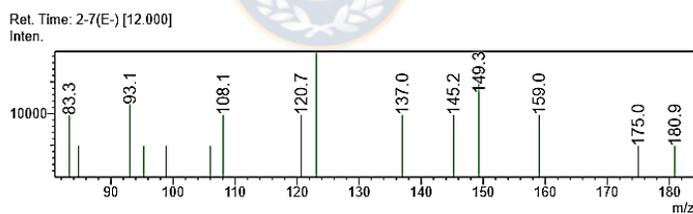


2072 *Ilustración 34* Cromatograma en tándem MS-MS para el m/z 319,10.

2073

2074 En la Ilustración 35 se describe el espectro del tandem MS-MS del ión
2075 molecular mayoritario 319,10 para la muestra 5 de *P. murcianum*.

2076



2077

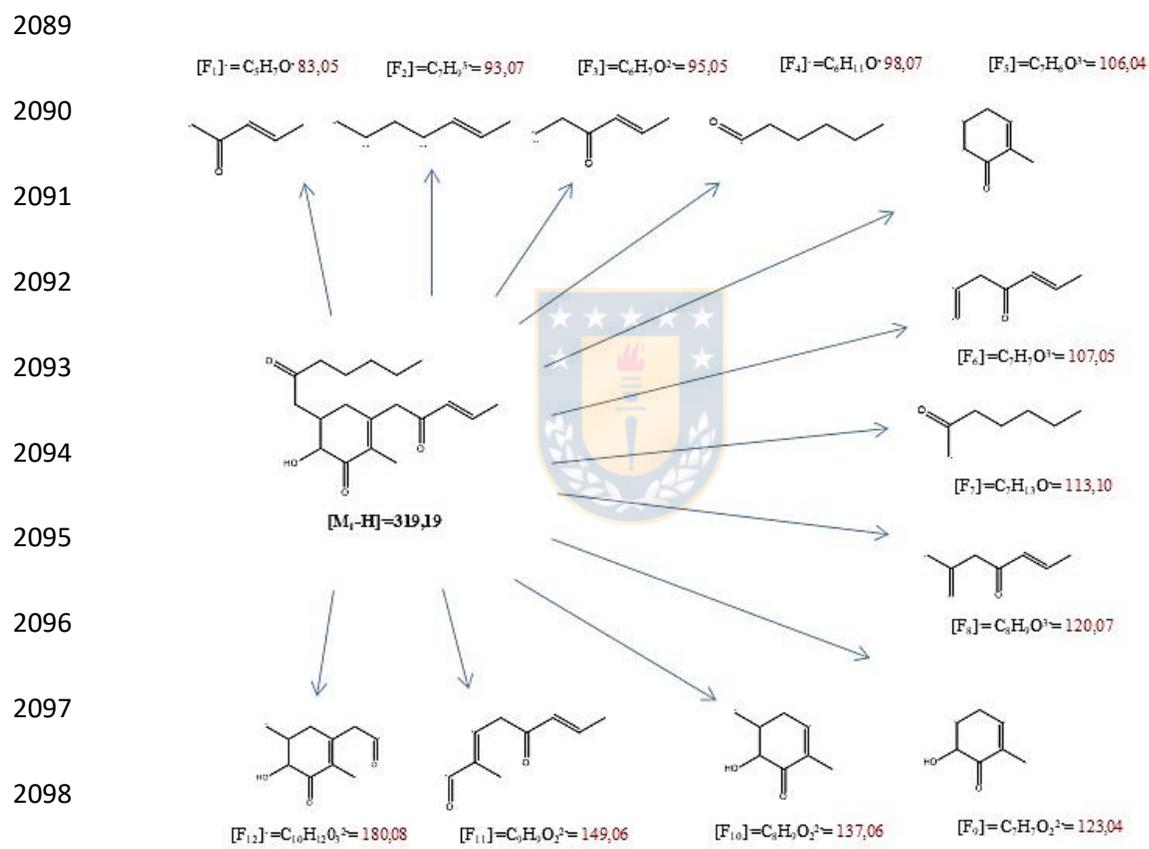
2078

2079 *Ilustración 35* Espectros de tándem MS-MS para el ión molecular 319,10 en
2080 muestra 5 de *P. murcianum*.

2081

2082 Se observan múltiples valores de m/z en el espectro con tándem MS-MS, que
2083 corresponderían a los fragmentos del ión molecular principal 319,10. Como
2084 anteriormente se propuso, este valor puede corresponder al ion molecular del

2085 pigmento monashexenona. Por lo que, a través del software ChemDraw® se
 2086 elaboraron los distintos fragmentos de la estructura química de
 2087 monashexenona y que explicarían el valor el tándem MS-MS. Los distintos
 2088 fragmentos propuestos se describen en la Ilustración 36.



2100 *Ilustración 36* Fragmentos de monashexenona obtenidos través de
 2101 software Chemdraw® para explicar el resultado del tándem MS-MS.

2102

2103

2104 En la Tabla 15 se realiza una comparación de los fragmentos obtenidos de
 2105 manera teórica y los valores de masa obtenidos por tándem MS-MS.

2106

2107 *Tabla 15 Valores de masa propuestos y valores experimentales obtenidos*
 2108 *por tándem MS-MS para ión molecular 319,10 en muestra 5 de P.*
 2109 *murcianum.*

Valor masa experimental	Valor masa teórico	Formación de aductos
83,30	[F ₁] ⁻ =83,05	-
93,10	[F ₂] ⁻ =93,07	-
95,10	[F ₃] ⁻ =95,05	-
98,80	[F ₄] ⁻ =98,07	-
106,00	[F ₅] ⁻ =106,40	-
108,10	[F ₆] ⁻ =107,05	107,05+H=108,06
120,7	[F ₈] ⁻ =120,07	-
123,0	[F ₉] ⁻ =123,04	-
137,00	[F ₁₀] ⁻ =137,06	-
145,2	[F ₇] ⁻ =113,10	113+CH ₃ OH=145
149,30	[F ₁₁] ⁻ =149,06	-
159,0	[F ₇] ⁻ =113,10	113+HCOOH=159
175,0	[F ₈] ⁻ =120,07	120,07+Na+CH ₃ OH=175,70
180,90	[F ₁₂] ⁻ =180,08	-

2110

2111 Con la información obtenida del tándem MS-MS, se entregan los espectros
 2112 que muestran los valores de m/z , correspondientes a los fragmentos del ión
 2113 molecular $m/z=319,10$. A través de ChemDraw®, se proponen los
 2114 fragmentos que se obtendrían desde monashexenona, entregando más

2115 antecedentes para confirmar la posibilidad de la presencia de este pigmento
2116 en la muestra 5 de *P. murcianum*.

2117 A través del análisis en tandem MS-MS se respalda una mayor posibilidad
2118 de que la muestra 3 presente monascin y la muestra 5 presente
2119 monashexenona para las fracciones más purificadas de *P. murcianum*.

2120

2121 • **b. Análisis de fracciones de *T. australis* por UHPLC-DAD-MS**

2122 El análisis de *T. australis*, muestra que se obtuvieron fracciones menos puras
2123 que en *P. murcianum*, ya que se observan múltiples señales cromatográficas
2124 con baja separación entre sí. Esto dificulta el análisis químico, pero a la vez
2125 evidencia la complejidad de la composición de las muestras. Esta gran
2126 presencia de pigmentos ya se había revelado previamente con los ensayos en
2127 HPTLC. En la Tabla 16 se reúne la información tentativa de pigmentos
2128 conocidos que podrían estar presentes en los extractos de *T. australis*, según
2129 la información de los espectros de masa analizados.

2130

2131

2132

2133 *Tabla 16 Datos obtenidos a partir de los espectros de masa para las muestras*

2134 *de T. australis.*

Muestra	t _R (min) Flujo: 1,0 mL/ min (MS)	t _R (min) Flujo: 0,6 mL/ min (MS-MS)	PDA λ (nm)	m/z	PM (g/mol)	Identificación tentativa/color
2	10,28	14,23	429, 458, 505	548,20	549,00	Atrorosin H ¹⁰²
	10,58	-	503, 622, 735, 754, 773	514,05	515,00	N-glucosyl rubropunctamine ⁸⁹
3	3,27	-	266, 484, 582, 656	303,05	304,68	1,5-Diaminochloro- 4,8- dihydroxyanthraquin one ¹⁰³
	4,82	-	443, 582, 656	454,00	455,00	N-threonyl rubropunctamin ⁸⁹
	11,50	-	330, 345,368, 463, 507, 675, 735, 755, 772	514,05	515,00	N- glucosylrubropuncta mine ⁸⁹
5	14,08	-	427, 457, 503, 754	411,20	412,48	(S)-Mitorubrinic acid ⁹¹
						Monaphilol D ⁹⁵
	14,40	-	431, 457, 501, 681, 754	265,15	266,29	1,4- Bis(methylamino)ant hraquinone (disperse blue) ¹⁰⁴
	14,45	-	431, 457, 503, 681, 754	510,00	511,22	N- glutarylmonascorubra mine ⁸⁹
	15,13	-	339, 431, 456, 503,754	410,20	411,17	PP-V ¹⁰⁵
				448,30	448,9	Falconesin E ¹⁰⁵
	16,43	-	431, 456, 500, 754	311,15	312,00	2-acetyl-3,8- dihydroxy-6- methoxyanthraquinon e ¹⁰⁶
	16,60	-	431, 457, 502, 754	357,25	358,00	Monankarin A-B ⁹⁵
						Rubropuctin ¹⁰⁷
						Monascin ¹⁰⁵
Arpink Red ^{TM88}						
			293,15	294,00	1,4- bis(ethylamino)anthra cene-9,10-dione ¹⁰⁸	
31	6,48	9,95	312, 405	281,05	282,00	Damnacanthal ⁸⁸

2135

2136 A través del análisis en modo scan en las muestras seleccionadas, se obtienen
2137 una gran variedad de compuestos presentes los que corresponden a azafilonas
2138 e hidroxiantraquinoides. Estos pigmentos presentan colores como amarillo,
2139 anaranjado, rojo, morado y azul. Las muestras seleccionadas para un análisis
2140 más detallado son la muestra 2 y la muestra 31, debido a la mejor definición
2141 de la señal cromatográfica. A continuación, se describen y discuten los
2142 resultados para la muestra 2 de *T. australis*.

2143

2144 • **Análisis de la muestra 2 de *T. australis* por UHPLC-DAD-MS-MS.**

2145 Se observa un cromatograma con baja separación entre las numerosas
2146 señales, siendo la más notoria a 14,38 min como se observa en la Ilustración
2147 37.

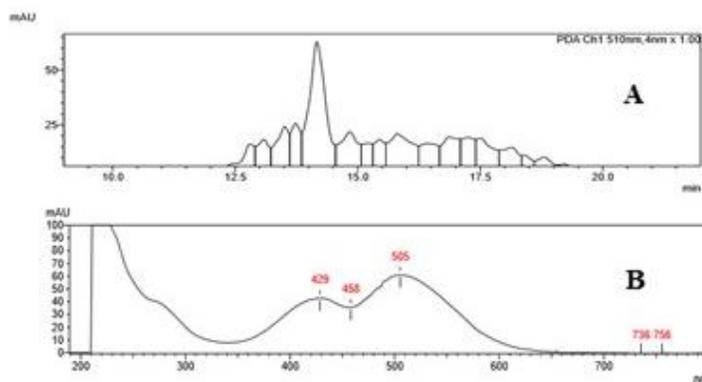
2148

2149

2150

2151

2152



2153 **Ilustración 37** (A) Cromatograma obtenido por HPLC; (B) Espectrograma
2154 UV-VIS desde 200-800 nm, para la muestra 2 de *T. australis*.

2155

2156 Se obtuvieron espectrogramas UV-VIS que muestran máximos mayoritarios
2157 en la región UV por debajo de 240 y a 270 nm. En la región del espectro
2158 visible se observan máximos a los 429, 458 y 505 nm. Estos valores
2159 corresponden a regiones características para pigmentos amarillos, naranjos y
2160 rojos.

2161 Las medidas de HPLC-DAD-MS modo scan revelan espectros que entregan
2162 un valor de masa de 548,20, que correspondería al ion molecular principal,
2163 esto se describe en la Ilustración 38^{36,102}.

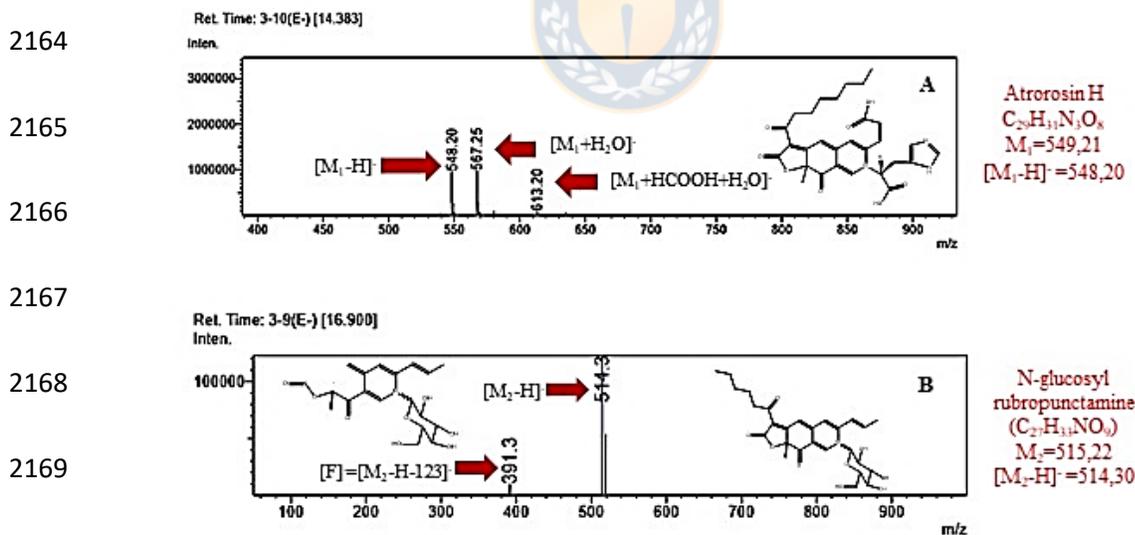


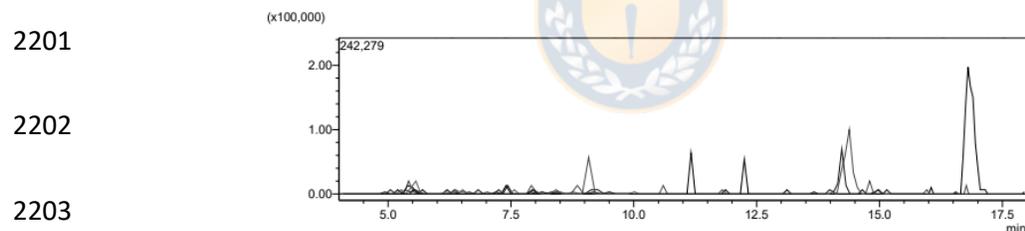
Ilustración 38 Espectros de masas modo scan a (A) $t_{R1} = 14,38$ min; (B) $t_{R2} = 16,90$ min y compuestos propuestos para la muestra 2 de *T. australis*.

2173 Los espectros que revelan un valor de masa de 548,20, que podría
2174 corresponder al ión molecular del pigmento mayoritario atrorosin H
2175 $C_{29}H_{31}N_3O_8$ (PM=549,00 g/mol). Además, en la misma muestra se observa
2176 una señal a 16,90 min con un valor de masa de 514,50 que podría
2177 corresponder a N-glucosyl-rubropunctamine $C_{27}H_{33}NO_9$ (PM=515,00)⁸⁹, un
2178 pigmento rojo glucosilado. En el caso de atrorosin H este pigmento rojo ha
2179 sido descrito por Isbrandt *et al*(2019)¹⁰² y pertenecería a las atrorosinas, un
2180 nuevo subgrupo de pigmentos tipo *Monascus* producidos por *T. atroroseus*.
2181 Estos pigmentos se caracterizan por presentar un aminoácido integrado al
2182 anillo de piridina que forma parte del anillo base de las azafilonas
2183 nitrogenadas, en este caso histidina. El valor de $[M-H]^- = 548,20$ se relaciona
2184 al valor descrito por Tolborg *et al.* (2019)¹⁰⁹, donde obtienen el valor de
2185 $[M+H]^+ = 550,22$ durante análisis LC-MS. Esto podría corresponder al valor
2186 de peso molecular de 549,20, difiriendo solo en el tipo de ionización utilizada
2187 (negativa/positiva).

2188 El ión molecular $[M_2-H]^- = 514,30$ se relaciona con el valor de $[M+H]^+ =$
2189 516,00 descrito por Hajjaj *et al.* (1997)⁸⁹ para N-glucosyl-rubropunctamine.
2190 En ambos casos podría corresponder al peso molecular de 515,00 y solo
2191 difiere en el tipo de ionización utilizada (negativa o positiva). El pigmento

2192 con el valor de $[M_2-H]^- = 514,30$, no presenta una señal notoria en el
2193 cromatograma, indicando una baja concentración de éste. Debido a esto, no
2194 se encontraron fragmentos en el análisis MS-MS, por lo que, el análisis en
2195 este caso se basó solo en el espectro de masa modo scan. Se observó otro
2196 valor de masa de $391,30^{110}$, que podría corresponder a un fragmento
2197 producido por N-glucosyl-rubropunctamine .

2198 Para obtener un mayor respaldo de los resultados obtenidos se cambió a
2199 tándem MS-MS. En este caso se seleccionó como ión molecular principal al
2200 valor m/z 548,20, cuyo cromatograma se muestra en la Ilustración 39.



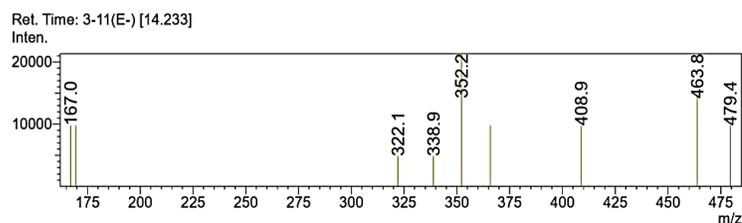
2204 ***Ilustración 39. Cromatograma en tándem MS-MS para el m/z 548,20.***

2205

2206 En este cromatograma se ven varios picos demostrando la presencia de
2207 múltiples compuestos, dificultando el análisis. Se observa una señal
2208 mayoritaria a los 16,90 min, pero en este caso la señal evaluada fue a los 14,
2209 233 min, donde existiría la presencia del valor m/z 548,20. En la Ilustración

2210 40 se muestra el espectro de tándem MS-MS, que describe los valores para
2211 el m/z 548,20.

2212



2214

2215

Ilustración 40 Espectros en tándem MS-MS para el m/z 548,20 para muestra

2216

2 de T. australis.

2217

2218 En la Ilustración 41 se observan los distintos fragmentos propuestos
2219 realizados a través del software ChemDraw® y que explicarían los resultados
2220 del análisis en tándem MS-MS.

2221

2222

2223

2224

2225

2226

2227

2228

2229

$[F_1]=C_{11}H_6NO^+=168,05$

$[F_2]=C_{18}H_{15}N_3O_3^+=321,11$

$[F_3]=C_{20}H_{20}NO_4^+=338,15$

2230

2231

2232

2233

2234

2235

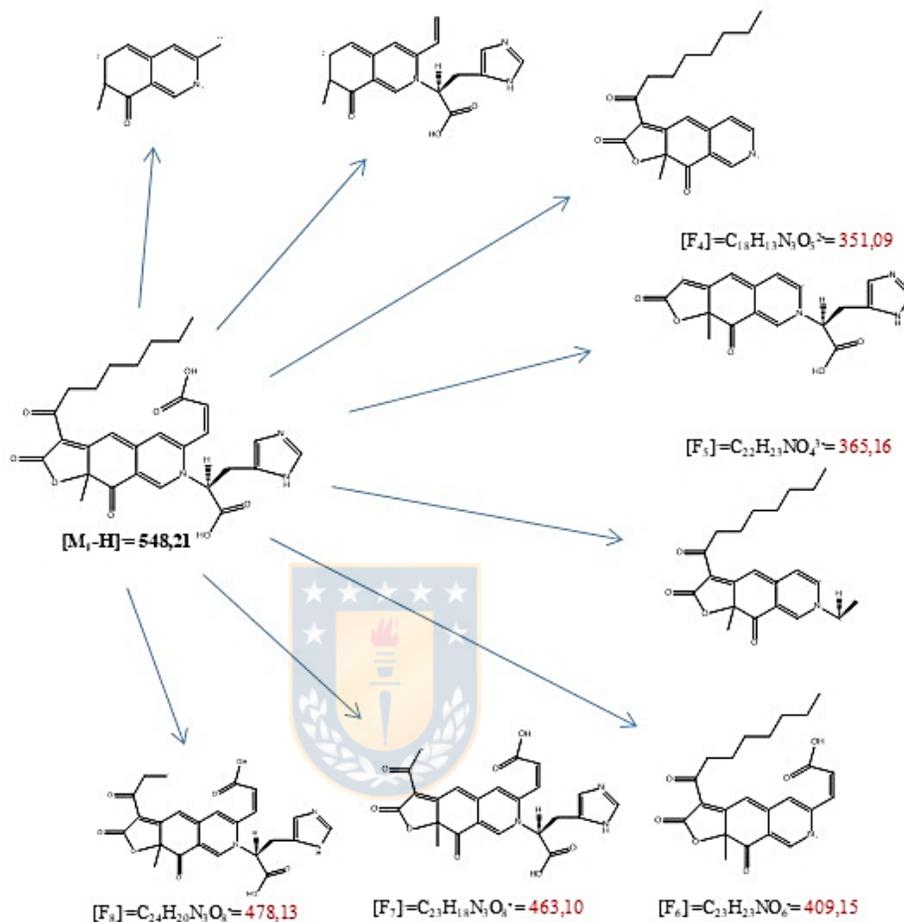
2236

2237

2238

2239

2240



2241 *Ilustración 41* Fragmentos de atrososin H obtenidos por software

2242 *Chemdraw® para explicar el resultado del tándem MS-MS.*

2243

2244 En la Tabla 17 se comparan los datos obtenidos experimentalmente con los

2245 fragmentos propuestos de manera teórica.

2246

2247 **Tabla 17** Comparación de fragmentos obtenidos del ión molecular 548,20
2248 por análisis MS-MS y de fragmentos propuestos de manera teórica.

Fragmento	Valor masa experimental	Valor masa teórico
[F1] ⁻	167,00	168,05
[F1] ⁻	169,00	168,05
[F2] ⁻	322,10	321,11
[F3] ⁻	338,90	338,15
[F4] ⁻	352,20	351,09
[F5] ⁻	365,80	365,16
[F6] ⁻	408,90	409,15
[F7] ⁻	463,80	463,10
[F8] ⁻	479,40	478,130

2249

2250 Con la información obtenida del tándem MS-MS, se entregan los espectros
2251 que muestran los valores de m/z , correspondientes a los fragmentos del ión
2252 molecular $m/z=548,20$. A través de ChemDraw®, se proponen los
2253 fragmentos que se obtendrían desde atrorosin H, entregando más
2254 antecedentes para confirmar la posibilidad de la presencia de este pigmento
2255 en la muestra 2 de *T. australis*.

2256

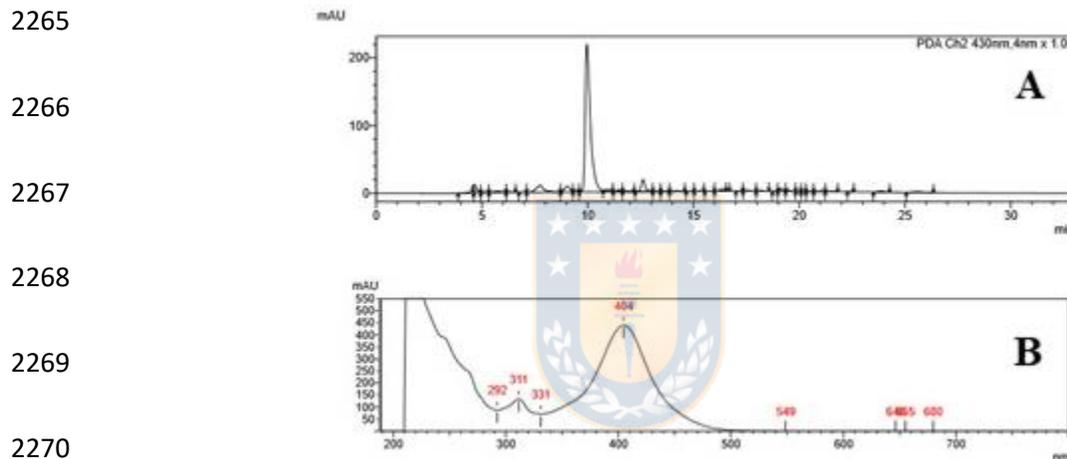
2257

2258

2259

2260 • **Análisis de la muestra 31 de *T. australis* por UHPLC-DAD-MS-**
2261 **MS**

2262 En la Ilustración 42 se observa la señal cromatográfica y el espectro UV-VIS
2263 para la muestra 31 de *T. australis*, que presenta una notoria señal a un t_R de
2264 9,95 min.

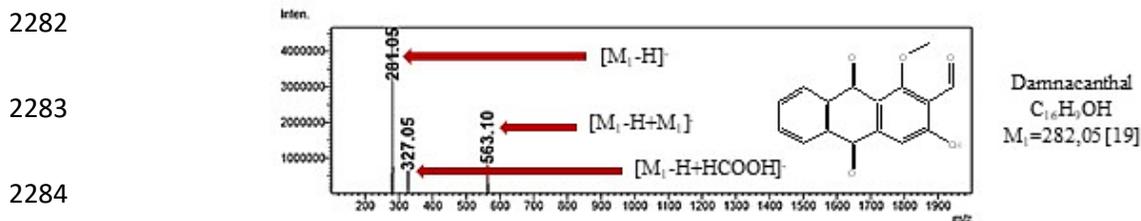


2271 *Ilustración 42 (A) Cromatograma obtenido por HPLC; (B) Espectrograma*
2272 *UV-VIS de 200-800 nm, para muestra 31 de *T. australis*.*

2273

2274 Este caso corresponde a una muestra que presenta una señal a los 9,95 min,
2275 por lo que se trataría de un pigmento más polar, que el detectado en la muestra
2276 2 (14,38 min). Además, se describe el espectrograma UV-VIS, donde se
2277 observa una señal predominante en la región UV entre 210 y 260 nm y una
2278 señal baja a 311 nm. En el espectro visible se observan un máximo a 404 nm,

2279 lo que es característico para pigmentos amarillos. Al realizar el análisis MS
2280 modo scan se obtiene un espectro con los valores de m/z que se describen en
2281 la Ilustración 43.



2285 *Ilustración 43* Espectro de masas con un $t_R=9,95$ min en muestra 31 de *T.*
2286 *australis*.

2287

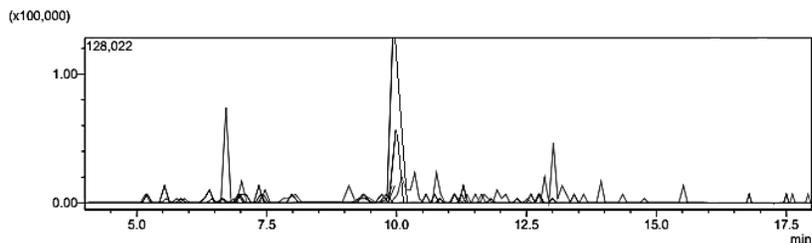
2288 Al analizar el espectro de MS modo scan, se observan 3 valores de m/z , de
2289 las cuales se selecciona el valor $m/z=281,05$ que podría corresponder al ion
2290 principal del pigmento hidroxiantraquinoide damnacanthal $C_{16}H_9OH$ (PM=
2291 $282,25$ g/mol)⁸⁸. También se observa un m/z 327,05, que correspondería al
2292 m/z 281,05 formando un aducto con HCOOH. Además, se observa un m/z
2293 563,10, que podría corresponder a dos moléculas de damnacanthal unidas y
2294 una de ellas sin un protón. Para obtener más antecedentes que aporten a la
2295 confirmación de la presencia del pigmento propuesto, se realizó un análisis
2296 en tándem MS-MS. En la Ilustración 44 se muestra el cromatograma para la
2297 muestra 31.

2298

2299

2300

2301



2302 *Ilustración 44* Cromatograma en tándem MS-MS para el m/z 281,05 para
2303 muestra 31 de *T. australis*.

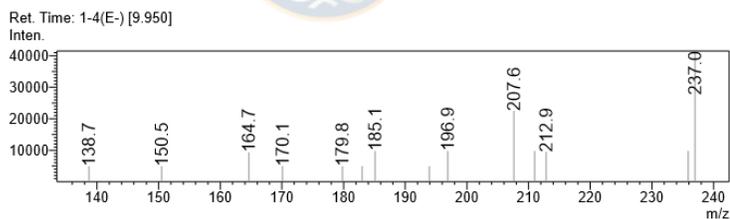
2304

2305 En este caso también se observa una gran variedad de picos, lo que dificulta
2306 el análisis. Pero se seleccionó el espectro a un $t_R=9,95$ min como se muestra
2307 en la Ilustración 45.

2308

2309

2310

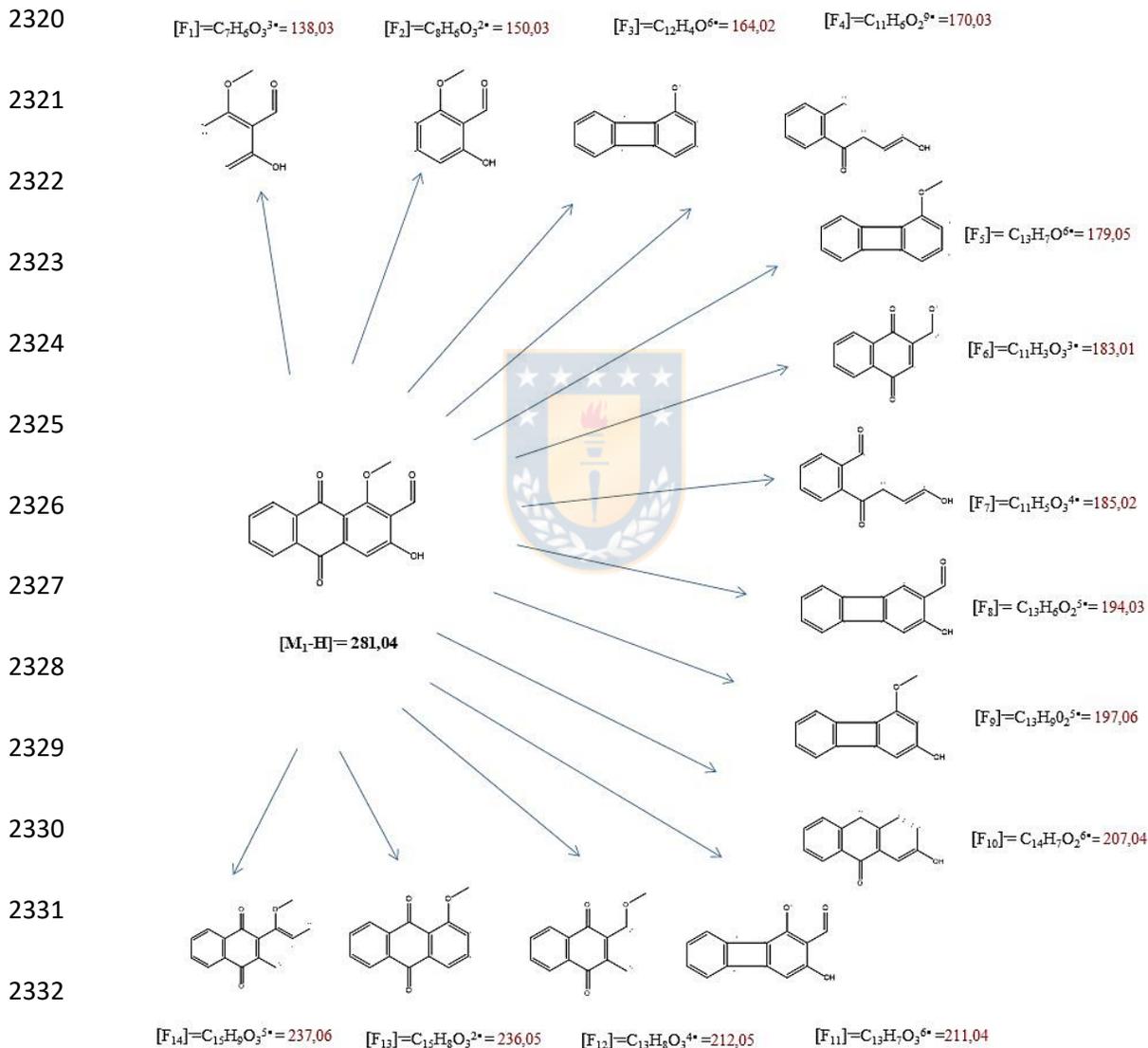


2311 *Ilustración 45* Espectros de masa-masa para el ión molecular 281,05 para
2312 la muestra 31 de *T. australis*.

2313

2314 En este cromatograma se observan múltiples valores de m/z que
2315 corresponderían a los fragmentos obtenidos a partir del ion molecular
2316 seleccionado.

2317 En la Ilustración 46 se muestran los distintos fragmentos obtenidos a través
 2318 del software Chem Draw®, lo que justificaría los resultados obtenidos por
 2319 tándem MS-MS.



2334 *Ilustración 46 Fragmentos tentativos de damnacanthal obtenidos de manera*
 2335 *teórica a través de software Chemdraw®.*

2336 En la Tabla 18 se comparan los datos obtenidos experimentalmente con los
2337 posibles fragmentos obtenidos por ChemDraw®, entregando más
2338 antecedentes para respaldar el análisis obtenido.

2339

2340 *Tabla 18 Valores de m/z de fragmentos obtenidos por tándem MS-MS y de*
2341 *fragmentos obtenidos de manera teórica a partir de ChemDraw®.*

Fragmento	Valor masa experimental	Valor masa teórico
[F ₁] ⁻	138,70	138,03
[F ₂] ⁻	150,50	150,03
[F ₃] ⁻	164,70	164,02
[F ₄] ⁻	170,10	170,03
[F ₅] ⁻	179,80	179,05
[F ₆] ⁻	183,00	183,01
[F ₇] ⁻	185,10	185,02
[F ₈] ⁻	194,00	194,03
[F ₉] ⁻	196,90	197,06
[F ₁₀] ⁻	207,60	207,04
[F ₁₁] ⁻	211,00	210,07
[F ₁₂] ⁻	212,90	212,05
[F ₁₃] ⁻	236,00	236,05
[F ₁₄] ⁻	237,00	237,06

2342

2343 Con la información obtenida del tándem MS-MS, se entregan los espectros
2344 que muestran los valores de m/z, correspondientes a los fragmentos del ión
2345 molecular m/z=281,05. A través de ChemDraw®, se proponen los
2346 fragmentos que se obtendrían desde damnacanthal, entregando más

2347 antecedentes para confirmar la posibilidad de la presencia de este pigmento
2348 en la muestra 31 de *T. australis*.

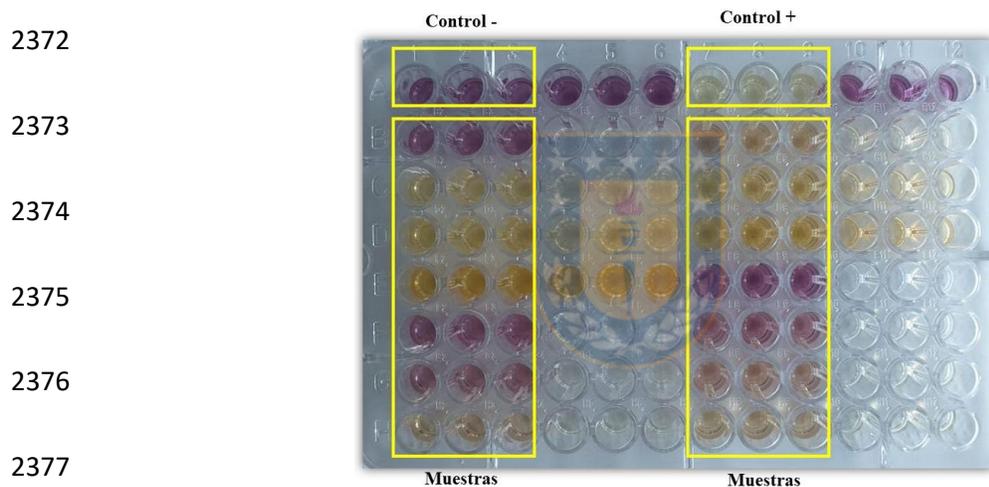
2349 A través de los resultados analizados en esta sección, se sugiere la presencia
2350 de azafilonas como monascin ($m/z=411,15$) y monashexenona ($m/z=319,10$)
2351 en *P. murcianum*. En el caso de *T. australis*, se detectó la presencia
2352 mayoritaria de la azafilona atrorosin H ($m/z=458,20$) y del
2353 hidroxiantraquinoide damnacantal ($m/z=281,05$). Esto contribuye a la
2354 dilucidación de la composición química de pigmentos en especies locales,
2355 poco estudiadas y que representan una novedosa fuente potencial de
2356 pigmentos funcionales, para la industria cosmética principalmente.

2357

2358 **6. Evaluación de propiedad antioxidante mediante ensayo con radical** 2359 **libre DPPH.**

2360 Actualmente existe una creciente demanda de productos “cosmeceúticos”, es
2361 decir cosméticos con alguna actividad biológica como, por ejemplo, efecto
2362 antioxidante, antiinflamatorio o antimicrobiano. Por ello, aquí se evaluaron
2363 los extractos y fracciones de *P. murcianum* y *T. australis* a través del ensayo
2364 de capacidad de eliminación de radicales DPPH. Este análisis se practica de
2365 forma rutinaria para evaluar el potencial de eliminación de radicales libres de

2366 una molécula antioxidante. Se considera uno de los métodos colorimétricos
2367 estándar y de fácil aplicación para la evaluación de las propiedades
2368 antioxidantes⁴³. Al aplicar el ensayo DPPH se observa efecto antioxidante,
2369 que se reconoce por la decoloración de la solución de DPPH, la que es de
2370 color morado. En la Ilustración 47 se observan algunas muestras analizadas
2371 dando una reacción positiva.



2378 *Ilustración 47* Microplaca de 96 pocillos con muestras de pigmentos
2379 *fúngicos analizados a través de la eliminación del radical libre DPPH.*

2380

2381 La reacción positiva indica que se produjo reducción del radical libre, lo que
2382 sería posible por la presencia de una sustancia donante de protones. A
2383 continuación, se analizan en más detalle las muestras que fueron analizadas
2384 por especie.

2385 • **Análisis del radical DPPH en muestras de *P. murcianum*.**

2386 En esta sección se evaluó la propiedad antioxidante dada por el extracto bruto
 2387 y las fracciones de *P. murcianum*. En la Tabla 19 se describen los resultados
 2388 de inhibición del radical DPPH en las muestras de *P. murcianum*.

2389

2390 **Tabla 19** Valores de inhibición del radical DPPH para extractos y fracciones
 2391 de *P. murcianum*. Las absorbancias son promedios \pm SD $n = 3$.

Muestra	% de inhibición de DPPH	Absorbancia corregida	Trolox equivalentes por gramo de muestra (μ mol de TE/g de muestra)
Control negativo	-	0,4020	-
Control positivo (hidroquinona)	98,23	0,0534	-
1	49,50	0,2030	155,29
2	35,20	0,2605	129,49
3	71,77	0,1135	195,47
4	38,88	0,2457	136,13
5	78,33	0,0871	207,32
6	46,74	0,2141	150,31
7	49,13	0,2045	154,62
8	55,37	0,1794	165,89
9	39,58	0,2429	137,39
10	32,64	0,2708	124,86
11	40,77	0,2381	139,54
12	37,86	0,2498	134,29
13	77,91	0,0888	206,55
14	83,03	0,0682	215,80
15	52,88	0,1894	161,40

2392

2393 En estos resultados destacan los porcentajes de inhibición mayores de 70%
2394 como las muestra 3, 5, 13 y 14. La muestra 3 representa a una fracción más
2395 polar de pigmentos, en cambio las muestras 5, 13 y 14 corresponden a
2396 fracciones de pigmentos menos polares. A partir de estos resultados se
2397 seleccionaron para análisis posteriores las muestras 3, 5 y 14 que presentaron
2398 un alto porcentaje de inhibición de radical DPPH. Además, se incluyó una
2399 muestra del extracto bruto, debido a que se espera trabajar con pigmentos
2400 microencapsulados del extracto total. También se realizaron ensayos con las
2401 muestras seleccionadas a distintas concentraciones. A partir de esto, se
2402 obtuvo la IC_{50} , que corresponde a la concentración de antioxidante, que se
2403 necesita para disminuir la cantidad inicial del radical DPPH a la mitad. En la
2404 Tabla 20 se describen los valores de inhibición del radical DPPH, para el
2405 extracto total de *P. murcianum* a distintas concentraciones.

2406

2407

2408 *Tabla 20 Concentraciones del extracto total de P. murcianum y sus*
 2409 *respectivos valores de inhibición de DPPH. Las absorbancias son promedios*
 2410 *± SD n =3.*

Concentración (mg/mL)	Inhibición DPPH (%)	Absorbancia corregida	Trolox equivalentes por gramo de muestra (µmol de TE/g de muestra)
Control negativo (metanol : agua)	-	0,6957	-
Control positivo (Hidroquinona)	98,23	0,0123	-
1,0	25,61	0,5175	14,14
5,0	56,27	0,3042	109,87
5,5	58,27	0,2903	116,11
6,5	60,17	0,2771	122,04
7,0	62,67	0,2597	129,85
7,5	66,68	0,2318	142,37
8,0	68,38	0,2200	147,67

2411

2412 A partir de la información descrita anteriormente, se observa que el extracto
 2413 total de *P. murcianum* alcanza una inhibición mayor al 68% equivalente a
 2414 147,67 µmol de TE/g de muestra con una concentración de 8,0 mg/mL.

2415 En la Ilustración 48 se observa el gráfico de la ecuación de la recta que
 2416 permite obtener el valor IC₅₀ para el extracto bruto de *P. murcianum*.

2417

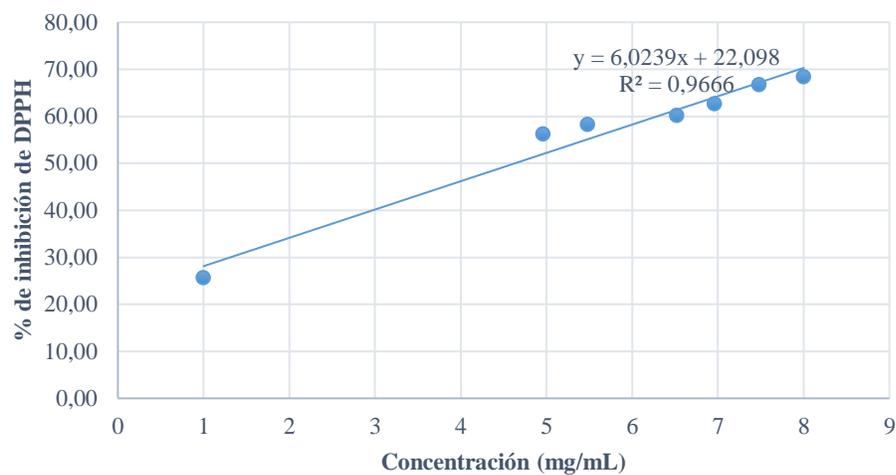
2418

2419

2420

2421

2422



2423 **Ilustración 48** Ecuación de la recta para obtención de IC_{50} del extracto total

2424 de *P. murcianum*.

2425

2426 Por lo tanto, a través de la ecuación de la recta, se obtiene que el extracto

2427 total de *P. murcianum* presenta una IC_{50} igual a 4,63 mg/mL.

2428 En la Tabla 21 se describen los porcentajes de inhibición del radical DPPH

2429 para la muestra 3 de *P. murcianum*, a distintas concentraciones.

2430

2431

2432 **Tabla 21** Inhibición de DPPH a distintas concentraciones para la muestra 3
 2433 de *P. murcianum*. Las absorbancias son promedios \pm SD $n = 3$.

Concentración (mg/mL)	Inhibición DPPH (%)	Absorbancia corregida	Trolox equivalentes por gramo de muestra (μ mol de TE/g de muestra)
Control negativo (metanol)	-	0,5253	-
Control positivo (Hidroquinona)	95,24	0,0250	-
1,2	25,83	0,3896	71,54
1,4	27,13	0,3828	74,60
2,0	31,43	0,3602	84,74
2,3	34,25	0,3454	91,38
2,5	37,54	0,3281	99,15
3,0	41,04	0,3097	107,41
5,0	61,94	0,1999	156,69
6,0	76,13	0,1254	190,13
7,0	79,54	0,1075	198,16
8,0	88,33	0,0613	218,90

2434

2435 A partir de la información descrita se observa que la muestra 3 de *P.*
 2436 *murcianum* alcanza una inhibición sobre el 88% que equivale a 218,90 μ mol
 2437 de TE/g de muestra a una concentración de 8,0 mg/mL.

2438 En la Ilustración 49 se observa el grafico de la ecuación de la recta que
 2439 permite obtener el valor IC₅₀ para la muestra 3 de *P. murcianum*.

2440

2441

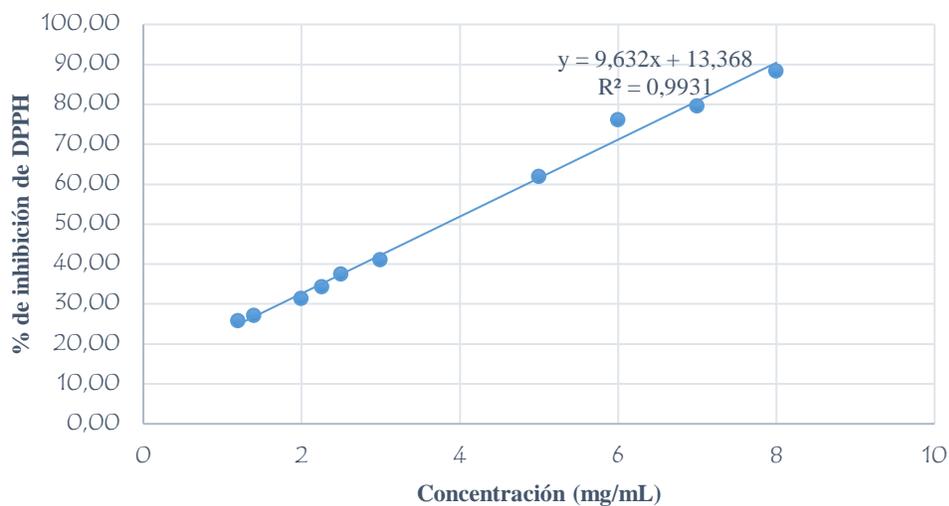
2442

2443

2444

2445

2446



2447

Ilustración 49 Ecuación de la recta para obtención de IC₅₀ de la muestra

2448

3 de P. murcianum.

2449

2450 Por lo tanto, a través de la ecuación de la recta, se obtiene que la muestra 3

2451 de *P. murcianum* presenta una IC₅₀ igual a 3,80 mg/mL.

2452 En la Tabla 22 se describen los porcentajes de inhibición del radical DPPH

2453 para la muestra 5 de *P. murcianum*, a distintas concentraciones.

2454

2455

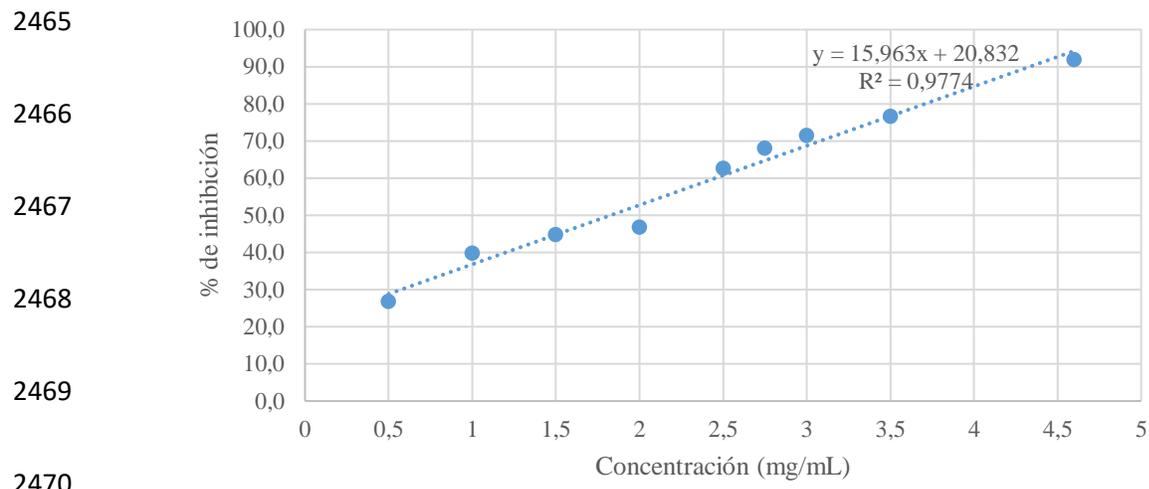
2456 **Tabla 22** Inhibición de DPPH a distintas concentraciones para la muestra 5
 2457 de *P. murcianum*. Las absorbancias son promedios \pm SD $n = 3$.

Concentración (mg/mL)	Inhibición DPPH (%)	Absorbancia corregida	Trolox equivalentes por gramo de muestra (μ mol /g)
Control negativo (metanol)	-	0,5600	-
Control positivo (hidroquinona)	91,7	0,0465	-
0,5	26,66	0,4107	62,07
1,0	39,75	0,3374	94,97
1,5	44,66	0,3099	107,32
2,0	46,75	0,2982	112,57
2,5	62,55	0,2097	152,29
2,8	68,05	0,1789	166,11
3,0	71,46	0,1598	174,69
3,5	76,55	0,1313	187,48
4,6	91,86	0,0456	225,94

2458

2459 A partir de la información descrita anteriormente se obtiene que la inhibición
 2460 de DPPH fue superior al 91% correspondiente a 225,94 μ mol de TE/g de
 2461 muestra para la muestra 5 de *P. murcianum* a una concentración de 4,6
 2462 mg/mL.

2463 En la Ilustración 50 se observa el grafico de la ecuación de la recta que
 2464 permite obtener el valor IC₅₀ para la muestra 5 de *P. murcianum*.



2471 **Ilustración 50** Ecuación de la recta para obtención de IC_{50} de la muestra 5

2472 de *P. murcianum*.



2473

2474 Por lo tanto, a través de la ecuación de la recta, se obtiene que la muestra 5

2475 de *P. murcianum* presenta una IC_{50} igual a 1,83 mg/mL.

2476 En la Tabla 23 se describen los porcentajes de inhibición del radical DPPH

2477 para la muestra 14 de *P. murcianum*, a distintas concentraciones.

2478

2479

2480 **Tabla 23** Distintas concentraciones de la muestra 14 de *P. murcianum* para
 2481 obtener IC_{50} . Las absorbancias son promedios $\pm SD$ $n = 3$.

Concentración (mg/mL)	Inhibición DPPH (%)	Absorbancia	Trolox equivalentes por gramo de muestra (μmol de TE/g de muestra)
Control negativo (metanol)	-	0,5600	-
Control positivo (hidroquinona)	91,7	0,0464	-
0,8	22,86	0,4320	22,86
0,9	23,20	0,4301	53,37
1,5	27,25	0,4074	63,55
1,8	29,79	0,3932	69,93
2,0	32,75	0,3766	77,38
3,5	43,32	0,3174	103,95
5,2	61,48	0,2157	149,60
7,0	71,00	0,1624	173,52
8,4	81,88	0,1015	200,85

2482

2483 A partir de la información descrita se obtiene una inhibición superior al 81%
 2484 que equivale a 200,85 μmol de TE/g de muestra. Esto se obtuvo a una
 2485 concentración de 8,4 mg/mL en la muestra 14 de *P. murcianum*.

2486 En la Ilustración 51 se observa el gráfico de la ecuación de la recta que
 2487 permite obtener el valor IC_{50} para la muestra 14 de *P. murcianum*.

2488

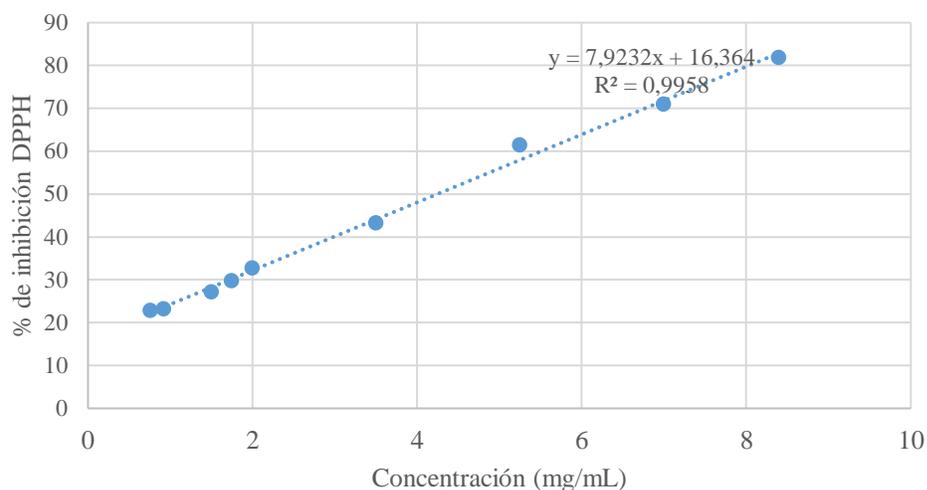
2489

2490

2491

2492

2493



2494 **Ilustración 51** Ecuación de la recta para obtención de IC₅₀ de la muestra

2495 14 de *P. murcianum*.

2496

2497 En este caso, a través de la ecuación de la recta, se obtiene que la muestra 14

2498 de *P. murcianum* presenta una IC₅₀ igual a 4,24 mg/mL.

2499 En la Tabla 24 se resume los valores de IC₅₀ para las muestras 1, 3, 5 y 14 de

2500 *P. murcianum*, 15 min posterior al montaje de la muestra.

2501

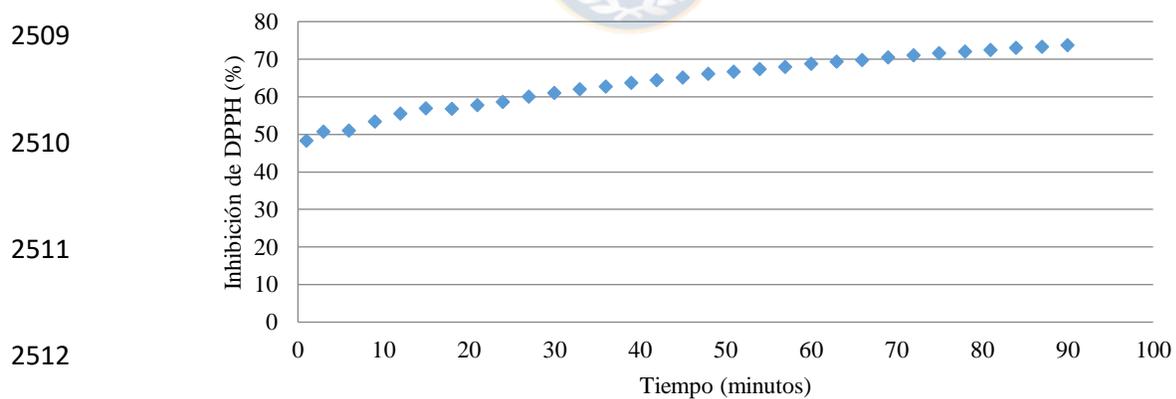
2502

2503 **Tabla 24** Inhibición del 50% de radical libre DPPH (IC_{50}) para muestras de
 2504 *P. murcianum*.

Muestras	IC_{50} (mg/mL)	Trolox equivalentes por gramo de muestra ($\mu\text{mol de TE/g de muestra}$)
1	4,63	15,87
3	3,80	21,11
5	1,83	41,79
14	4,24	18,77

2505

2506 También se evaluó la cinética de inhibición de DPPH del extracto total de *P.*
 2507 *murcianum*. A continuación, se describe la gráfica de este proceso en la
 2508 Ilustración 52.



2513 **Ilustración 52** Cinética de inhibición del radical DPPH por el extracto
 2514 total de *P. murcianum* durante 90 minutos.

2515

2515

2516 Se observa una inhibición del 50% que aumenta hasta aproximadamente 80%
 2517 a los 90 min. Esta información pudiera ser de gran utilidad en un preparado
 2518 de uso cosmético realizado a partir del extracto total. En general, se puede
 2519 observar una propiedad antioxidante positiva, tanto del extracto bruto como
 2520 de las fracciones analizadas.

2521

2522 • **Análisis del radical DPPH en muestras de *T. australis*.**

2523 En esta sección se evaluó la propiedad antioxidante dada por el extracto bruto
 2524 y las fracciones de *T. australis*. En la Tabla 25 se describen los resultados de
 2525 inhibición del radical DPPH.

2526

2527 **Tabla 25** *Valores de inhibición del radical DPPH para extractos y fracciones*
 2528 *de T. australis. Las absorbancias son promedios \pm SD n =3.*

Muestra	Absorbancia	% de inhibición de DPPH	Trolox equivalentes por gramo de muestra (μ mol de TE/g de muestra)
Control negativo	0,3723	-	-
Control positivo	0,0260	93,0	-
1	0,2383	36,0	87,17
2	0,3526	5,3	10,79
3	0,3353	9,9	22,35
4	0,6267	68,3	172,38
5	0,6507	42,8	188,42

6	0,3513	5,6	11,65
7	0,3017	19,0	44,80
8	0,3597	3,4	6,04
9	0,3480	6,5	13,86
10	0,3250	12,7	29,23
11	0,3523	5,4	10,99
12	0,3157	15,2	35,44
13	0,2263	39,2	95,18
14	0,3250	12,7	29,23
15	0,1143	69,3	170,03
16	0,3683	1,1	0,29
17	0,2967	20,3	48,14
18	0,2713	27,1	65,11
19	0,1883	49,2	120,58
20	0,1443	61,2	143,30
21	0,2320	37,7	91,38
22	0,1357	63,6	155,73
23	0,3683	1,1	0,29
24	0,3483	6,4	13,66
25	0,3533	5,1	10,32
26	0,3280	11,9	27,22
27	0,3653	1,9	2,30
28	0,4697	16,0	67,47
29	0,4200	24,9	34,25
30	0,0997	82,2	179,78
31	0,3203	42,7	32,37
32	0,3163	43,4	35,04
33	0,3655	34,6	2,17
34	0,3158	43,5	35,38
35	0,2193	60,8	99,86
36	0,1392	75,1	153,39
37	0,3633	35,0	3,64
38	0,3390	39,4	19,87
39	0,2313	58,6	91,84
40	0,4680	16,3	66,33
41	0,1790	68,0	126,79

2529

2530 A partir del análisis preliminar de inhibición de DPPH para selección de

2531 muestras, destacan los porcentajes de inhibición mayores a 60% en las

2532 muestras 4 (68,3%), 15 (69,3%), 20 (61,2%), 22 (63,6%), 30 (82,2%), 35
2533 (60,8%) y 36 (75,1%).

2534 Existen varias muestras con un porcentaje de inhibición de DPPH sobre un
2535 60%, pero muchas fueron descartadas por su bajo rendimiento en el
2536 fraccionamiento. A partir de esto, se eligieron para ensayos más específicos
2537 las muestras 20, 35 y 36. También se realizaron pruebas con el extracto bruto,
2538 ya que, representa el comportamiento que tendría el producto final que
2539 pretende ser elaborado a partir de éste. En la Tabla 26 se describen los
2540 porcentajes de inhibición del radical DPPH para el extracto total de *T.*
2541 *australis*, a distintas concentraciones.

2542

2543

2544

2545

2546

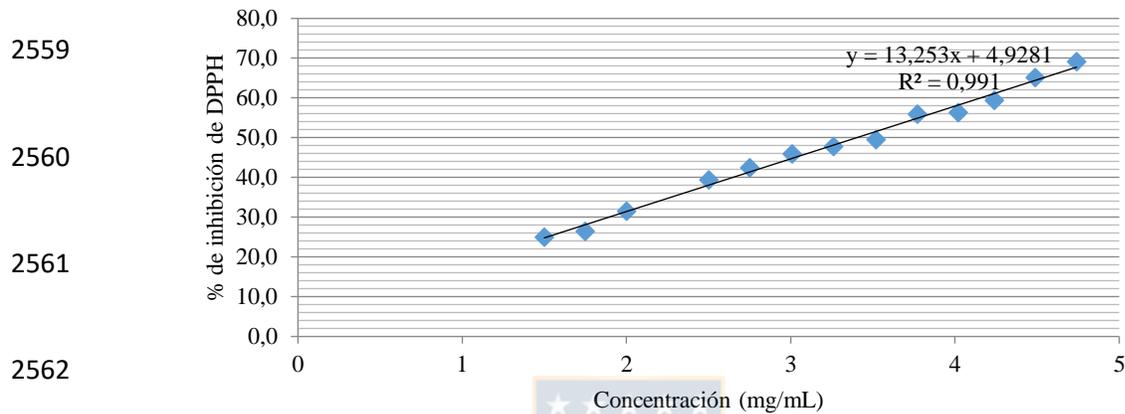
2547 **Tabla 26** Distintas concentraciones del extracto total de *T. australis* para
 2548 obtener IC_{50} . Las absorbancias son promedios $\pm SD$ $n = 3$.

Concentración (mg/mL)	% inhibición DPPH	Absorbancia corregida	Trolox equivalentes por gramo de muestra (μmol de TE/g de muestra)
Control negativo(metanol:agua)	-	0,6957	-
Control positivo (hidroquinona)	98,2	0,0123	-
1,5	25,0	0,5218	39,87
1,8	26,5	0,5113	35,31
2,0	31,6	0,4758	38,13
2,5	39,5	0,4209	38,36
2,8	42,5	0,4000	36,92
3,0	46,0	0,3757	37,35
3,3	47,8	0,3632	35,31
3,5	49,6	0,3506	34,58
3,8	56,0	0,3061	36,04
4,0	56,4	0,3033	34,49
4,2	59,4	0,2824	34,62
4,5	65,2	0,2421	35,52
4,7	69,2	0,2143	36,12

2549

2550 A partir de la información entregada, se observa una inhibición superior al
 2551 69,2 % equivalente a un 36,12 μmol de TE/g de muestra lo que resulta
 2552 bastante bajo. Esto se podría explicar por una posible interferencia entre el
 2553 extracto total, el que presenta una coloración rojiza intensa, lo que podría
 2554 alterar la medición de absorbancia DPPH cuya lectura es a 517 nm, valor que
 2555 está dentro del rango de absorción de pigmentos rojos.

2556 En la Ilustración 53 se observa el grafico de la ecuación de la recta que
2557 permite obtener el valor IC₅₀ para la muestra 1 de *T. australis* que
2558 corresponde al extracto total.



2563 *Ilustración 53 Ecuación de la recta para obtención de IC₅₀ del extracto*
2564 *total de T. australis.*

2565 A partir de la ecuación de la recta, se obtiene que el extracto total de *T.*
2566 *australis* presenta una IC₅₀ igual a 3,40 mg/mL.

2567 En la Tabla 27 se describen los porcentajes de inhibición del radical DPPH
2568 para la muestra 20 de *T. australis*, a distintas concentraciones.

2569

2570 *Tabla 27 Concentraciones de la muestra 20 de T. australis para inhibir*
 2571 *DPPH. Las absorbancias son promedios \pm SD n =3.*

Concentración (mg/mL)	Inhibición DPPH (%)	Absorbancia corregida	Trolox equivalentes por gramo de muestra (μ mol de TE/g de muestra)
Control negativo(metanol)	-	0,7350	-
Control positivo (hidroquinona)	93,7	0,0463	-
0,5	25,2	0,5498	120,62
0,8	37,4	0,4601	113,34
1,2	42,9	0,4200	86,87
1,8	60,0	0,2940	81,61
2,0	65,4	0,2543	80,17
2,3	73,5	0,1948	78,47
2,5	76,7	0,1712	75,38

2572

2573 A partir de la información entregada se obtiene una inhibición de DPPH
 2574 superior al 76%, lo que equivale a 75,38 μ mol de TE/g de muestra con una
 2575 concentración de 2,5 mg/mL de la muestra 20 de *T. australis*.

2576 En la Ilustración 54 se observa el gráfico de la ecuación de la recta que
 2577 permite obtener el valor IC₅₀ para la muestra 20 de *T. australis*.

2578

2579

2580

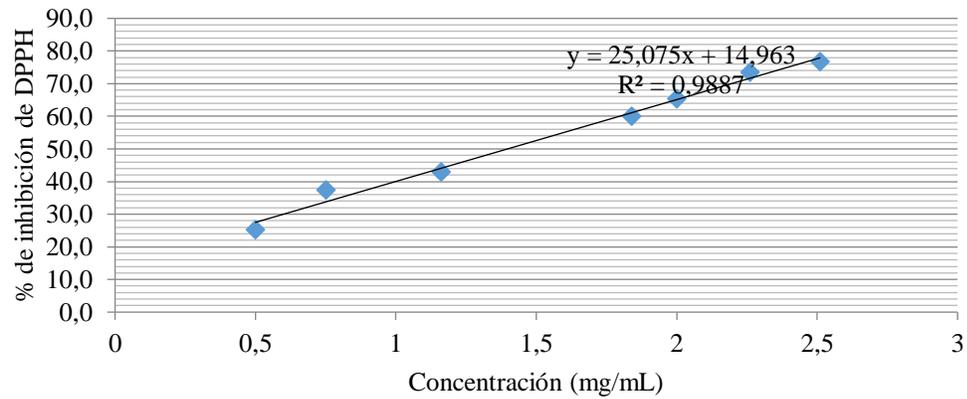
2581

2582

2583

2584

2585



2586

2587 *Ilustración 54 Ecuación de la recta para obtención de IC₅₀ de la muestra 20*

2588 *de T. australis.*



2589

2590 A partir de la ecuación de la recta, se obtiene que la muestra 20 de *T. australis*

2591 presenta una IC₅₀ igual a 1,39 mg/mL.

2592 En la Tabla 28 se describen los porcentajes de inhibición del radical DPPH

2593 para la muestra 35 de *T. australis*, a distintas concentraciones con un tiempo

2594 de lectura de 15 min posterior al montaje de la muestra.

2595

2596 **Tabla 28** Concentraciones de la muestra 35 de *T. australis* para inhibir
 2597 *DPPH*. Las absorbancias son promedios \pm SD $n = 3$.

Concentración muestra (mg/mL)	% inhibición DPPH	Absorbancia corregida	Trolox equivalentes por gramo de muestra (μmol de TE/g de muestra)
Control negativo (metanol)	-	0,8713	
Control positivo (hidroquinona)	94,5	0,0479	
0,5	15,5	0,7362	72,39
0,8	24,2	0,6604	72,30
1,0	34,9	0,5672	84,45
1,2	35,6	0,5611	71,83
1,8	50,4	0,4322	68,33
2,0	58,0	0,3659	70,97
2,5	67,1	0,2867	65,82

2598

2599 A partir de la información entregada se observa que la muestra 35 de *T.*
 2600 *australis* alcanza una inhibición mayor al 67%, lo cual equivale a 65,82 μmol
 2601 de TE/g de muestra.

2602 En la Ilustración 55 se observa el grafico de la ecuación de la recta que
 2603 permite obtener el valor IC_{50} para la muestra 35 de *T. australis*.

2604

2605

2606

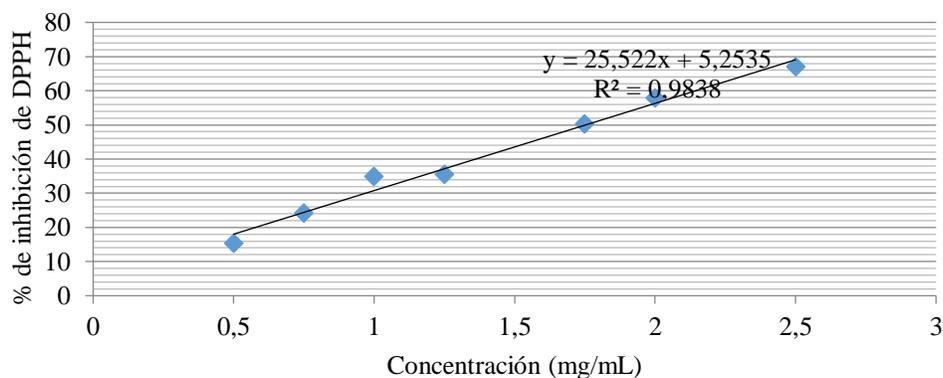
2607

2608

2609

2610

2611



2612 *Ilustración 55 Ecuación de la recta para obtención de IC₅₀ de la muestra 35*

2613 *de T. australis.*

2614

2615 A partir de la ecuación de la recta, se obtiene que la muestra 35 de *T. australis*
2616 presenta una IC₅₀ igual a 1,75 mg/mL.

2617 En la Tabla 29 se describen los porcentajes de inhibición del radical DPPH
2618 para la muestra 36 de *T. australis*, a distintas concentraciones con un tiempo
2619 de lectura de 15 min posterior al montaje de la muestra.

2620

2621

2622 *Tabla 29 Concentraciones de la muestra 36 de T. australis para inhibir*
 2623 *DPPH. Las absorbancias son promedios \pm SD n =3.*

Concentración muestra 36 (mg/mL)	Inhibición DPPH (%)	Absorbancia	Equivalentes de Trolox por gramo de muestra (μmol de ET/g de muestra)
Control negativo(metanol)	-	0,8713	-
Control positivo (hidroquinona)	94,5	0,0479	-
0,7	31,8	0,5942	109,63
0,8	36,1	0,5568	109,28
0,9	37,7	0,5428	101,58
1,2	45,8	0,4722	92,98
1,4	53,6	0,4043	93,55
1,6	54,9	0,3930	83,87
1,8	59,2	0,3555	80,50
1,9	65,7	0,2989	84,77
2,0	70,7	0,2553	86,76
2,2	71,6	0,2474	79,89
2,5	77,8	0,1934	76,47

2624

2625 La información entregada describe que la muestra 36 de *T. australis* alcanza
 2626 una inhibición de DPPH mayor al 77,8% lo que equivale a 76,47 μ mol de
 2627 TE/g de muestra.

2628 En la Ilustración 56 se observa el grafico de la ecuación de la recta que
 2629 permite obtener el valor IC₅₀ para la muestra 36 de *T. australis*.

2630

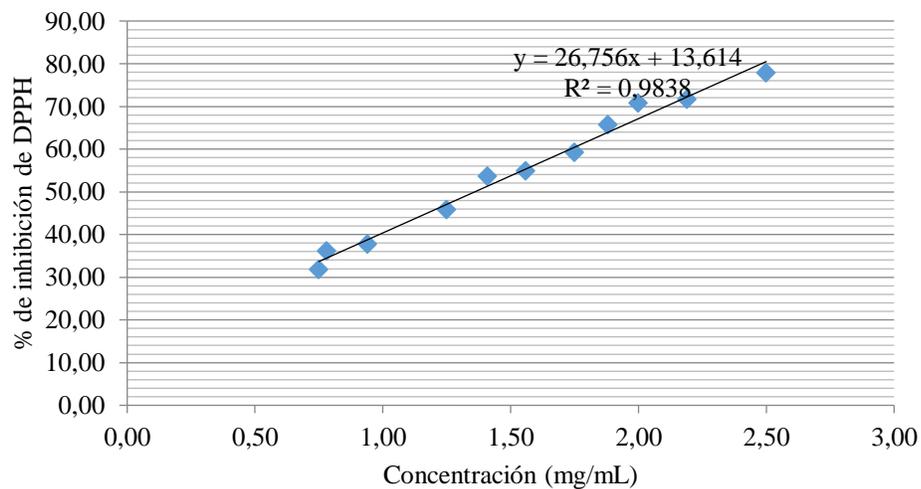
2631

2632

2633

2634

2635



2636 **Ilustración 56** Ecuación de la recta para obtención de IC_{50} de la muestra 36

2637 de *T. australis*.



2638

2639 A partir de la ecuación de la recta, se obtiene que la muestra 36 de *T. australis*

2640 presenta una IC_{50} igual a 1,36 mg/mL.

2641 En la Tabla 30 se resume los valores de IC_{50} para las muestras 1, 20, 35 y 36

2642 de *T. australis*, 15 min posterior al montaje de la muestra.

2643

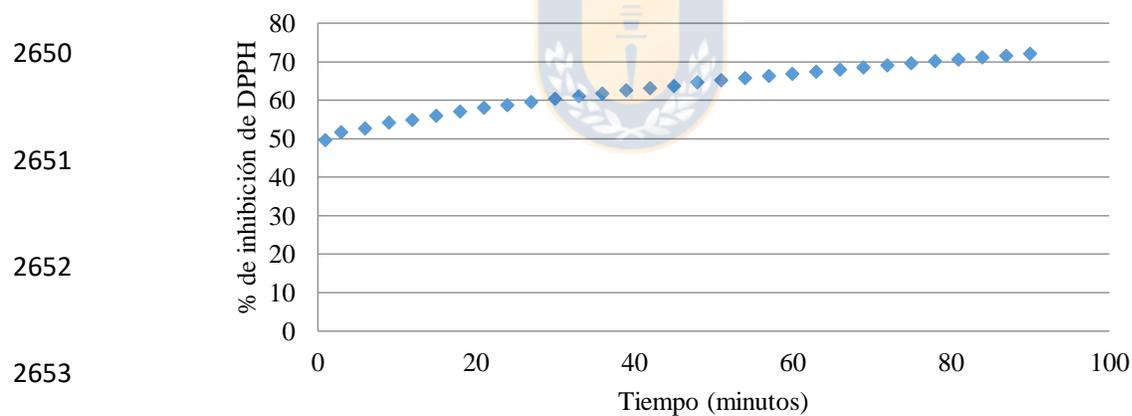
2644

2645 **Tabla 30** Concentraciones para la inhibición del 50% de radical libre DPPH
 2646 (IC_{50}) para extractos y fracciones de *T. australis*.

Muestras	IC_{50} (mg/mL)	Equivalentes de Trolox por gramo de muestra (μmol de ET/g de muestra)
1	3,40	35,9
20	1,39	87,8
35	1,75	69,7
36	1,36	89,7

2647

2648 Además, se estudió la cinética de inhibición de DPPH que presenta el extracto
 2649 total de *T. australis*, la gráfica de este proceso se detalla en la Ilustración 57.

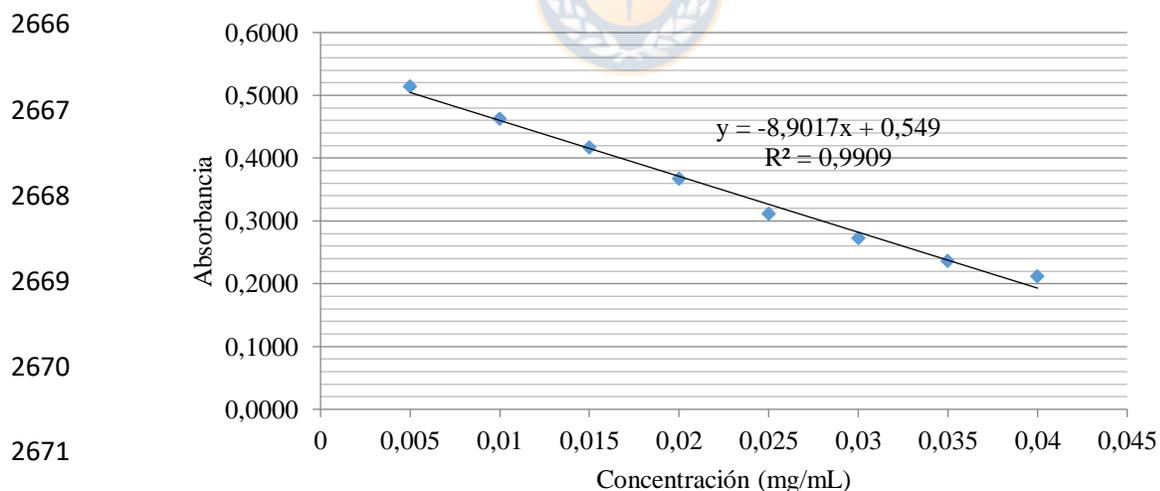


2654 **Ilustración 57** Cinética de inhibición del radical DPPH por el extracto total
 2655 de *T. australis* durante 90 minutos.

2656

2657 En la gráfica de cinética se observa una inhibición que parte del 50% y que
2658 aumenta por sobre el 70% a los 90 min. Si se compara con la cinética obtenida
2659 para *P. murcianum* que supera el 80% de inhibición, *T. australis* tendría una
2660 potencia menor, porque supera solo el 70%. Sin embargo, no deja de ser una
2661 actividad antioxidante importante, la cual puede ser de gran utilidad en
2662 preparados de uso cosmético elaborados a partir de los extractos brutos.

2663 A continuación, en la Ilustración 58 se observa la curva de la concentración
2664 de trolox que se utilizó para estandarizar los resultados de inhibición de
2665 DPPH obtenidos para ambas especies estudiadas.



2672 **Ilustración 58** Curva para determinar los equivalentes trolox de las
2673 muestras evaluadas en ensayo DPPH.

2674

2675 En general, para ambas especies se lograron altas inhibiciones de DPPH
2676 confirmando que las muestras presentan propiedad antioxidante, pero para
2677 esto fue requerido utilizar una alta concentración de muestra. Las
2678 inhibiciones de DPPH fueron cercanas al 80% en varias muestras analizadas.
2679 Se registró un valor de IC₅₀ de 4,63 mg/mL para el extracto total de *P.*
2680 *murcianum* y de 3,40 mg/mL para el extracto total de *T. australis*. En el caso
2681 de las fracciones purificadas, para *P. murcianum* destaca la muestra 5 con un
2682 IC₅₀ de 1,83 mg/mL y para *T. australis* la muestra 36 con un IC₅₀ de 1,36
2683 mg/mL.

2684 Uno de los inconvenientes que se presentó con este método fue una posible
2685 interferencia, sobre todo en las muestras de *T. australis*, las que presentaban
2686 una coloración rojiza más intensa. De esta forma se podría alterar la medición
2687 de absorbancia de DPPH, cuya lectura es a 517 nm, valor que está dentro del
2688 rango de absorción de pigmentos rojos. Es por esto, que en la siguiente
2689 sección se presenta otra alternativa de evaluación de la propiedad
2690 antioxidante, la cual no interferiría con las características propias de las
2691 muestras.

2692

2693 **7. Evaluación de propiedad antioxidante mediante ensayo de capacidad**
2694 **de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).**

2695 Debido a la necesidad de analizar con mayor efectividad la propiedad
2696 antioxidante, fue necesario encontrar un método que se adapte a los
2697 requerimientos de la muestra. Para esto, se utilizó el ensayo de la capacidad
2698 de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), que es un método que permite
2699 observar y cuantificar la capacidad antioxidante hidrofílica de los extractos.

2700 Para esto utiliza como fuente radicalaria al AAPH y como sustrato la proteína
2701 fluorescente fluorosceína. El decaimiento de la fluorescencia de la proteína
2702 indica el daño recibido por AAPH, por lo tanto, el retardo en el decaimiento
2703 de la fluorescencia indica protección antioxidante. Como este método se basa
2704 en la detección de la fluorescencia, no habría interferencias como en el caso
2705 del ensayo con DPPH, que mide la decoloración al visible, y posiblemente
2706 haya interferencias de pigmentos coloreados en la lectura.

2707 En la evaluación de la propiedad antioxidante a través del ensayo ORAC, se
2708 obtuvieron los valores de distintas muestras en ambas especies estudiadas.
2709 Los resultados fueron expresados en base a un estándar de trolox y se
2710 describen a continuación en la Tabla 31.

2711

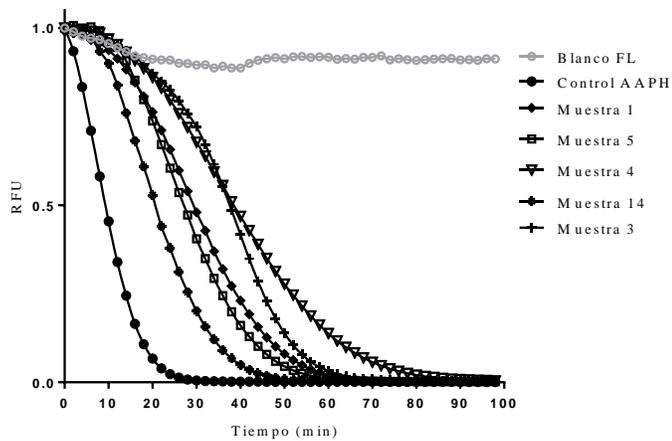
2712 **Tabla 31** Valores obtenidos del ensayo de capacidad de absorción de
 2713 radicales de oxígeno (ORAC).

Especie	Muestra	Valor ORAC (μM Trolox equivalentes (TE) / mL de Muestra)
<i>P. murcianum</i>	1	118,2
	3	2130,4
	4	572,3
	5	477,5
	14	245,0
<i>T. australis</i>	1	239,2
	2	235,7
	5	261,4
	19	565,9
	30	706,4
	38	620,4
	40	243,3

2714

2715 A partir de la información descrita, se observan mejores resultados que en los
 2716 ensayos por DPPH. Los valores de equivalentes trolox, resultan bastante
 2717 altos, sobretodo en la muestra 3 de *P. murcianum* (2130,4 μM trolox
 2718 equivalentes / mL de muestra) y la muestra 30 de *T. australis* (706,4 μM
 2719 trolox equivalentes / mL de muestra).

2720 En la Ilustración 59 se observan las distintas curvas que se obtienen a partir
 2721 del ensayo ORAC para las muestras de *P. murcianum*.



2722

2723 *Ilustración 59* Lecturas de fluorescencia relativa en el tiempo para las

2724 *muestras de P. murcianum.*



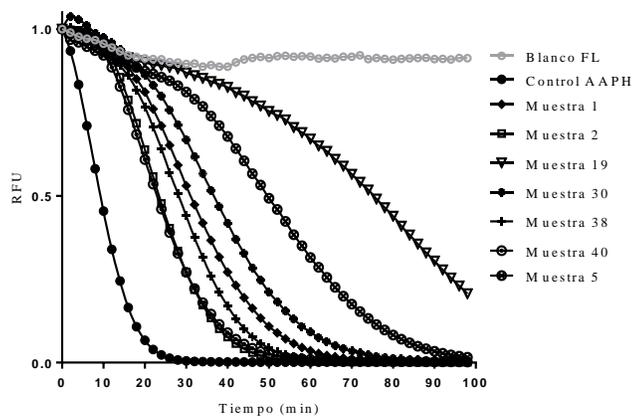
2725

2726 En este caso hay muchas muestras destacables cuyo decaimiento de la curva

2727 es gradual finalizando casi a los 100 min. En la Ilustración 60 se observan las

2728 curvas de decaimiento de fluorescencia del ensayo ORAC para las muestras

2729 de *T. australis*.



2730

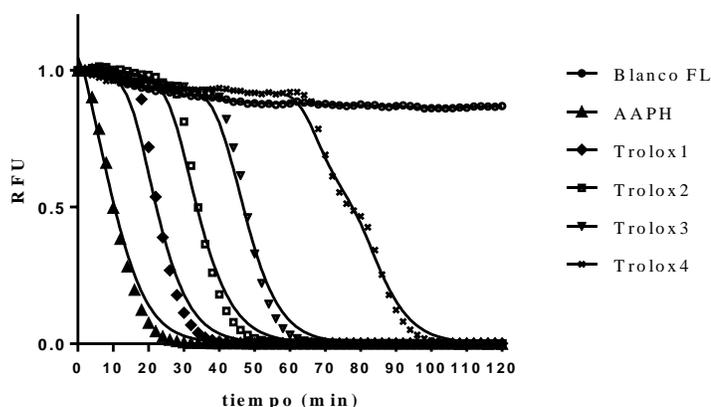
2731 *Ilustración 60* Lecturas de fluorescencia relativa en el tiempo para las
 2732 muestras de *T. australis*.

2733



2734 El decaimiento de la fluoresceína indica el daño recibido por el radical
 2735 AAPH, por lo tanto, el retardo en el decaimiento de la fluorescencia indica
 2736 protección antioxidante. A partir de la información obtenida se observa una
 2737 reducción gradual de la fluorescencia, destacando la muestra 3 para *P.*
 2738 *murcianum* y las muestras 19 y 30 para *T. australis*, cuyas curvas decaen
 2739 gradualmente hasta llegar a los 100 min.

2740 En la Ilustración 61 se observan las distintas mediciones ORAC para el
 2741 estándar trolox a distintas concentraciones.



2742

2743 *Ilustración 61* Lecturas de fluorescencia relativa en el tiempo para distintas
 2744 concentraciones de trolox.

2745



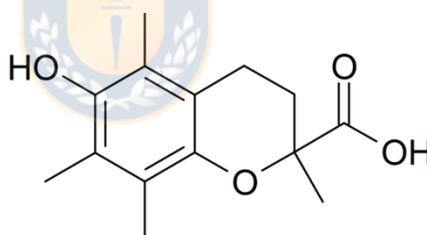
2746 Se comprobó al aplicar el ensayo ORAC, que los valores de trolox
 2747 equivalentes difieren con los obtenidos en el ensayo con DPPH. Por ejemplo,
 2748 la muestra 3 de *P. murcianum* presentó 71,77% de inhibición del radical
 2749 DPPH expresado en 195,47 μmol trolox equivalentes / g de muestra. Por otro
 2750 lado, en el ensayo ORAC, la misma muestra obtuvo un valor de 2130,4 μM
 2751 trolox equivalentes / mL de muestra, siendo la fracción con el valor más alto.
 2752 Esta muestra fue analizada por UHPLC/MS-MS, arrojando resultados
 2753 preliminares de la composición química, la cual podría corresponder
 2754 principalmente a monascin cuya actividad antioxidante, antiinflamatoria y

2755 antiobesidad, ya ha sido documentada¹¹¹. Además, la muestra 5 de *P.*
2756 *murcianum* que presentó un valor ORAC de 477,5 μM trolox equivalentes /
2757 mL, podría estar compuesta principalmente por monashexenona, según
2758 análisis UHPLC-MS-MS. Por otro lado, también se obtuvieron compuestos
2759 tentativos por UHPLC modo scan, como monankarin y monaphilol, y de
2760 antraquinoides como endocrocín y ácido flavokermesico. Estos pigmentos
2761 podrían ser responsables de la coloración amarilla del extracto y del efecto
2762 antioxidante^{112,113}. En el ensayo ORAC además destaca la muestra 30 de *T.*
2763 *australis* con el valor ORAC correspondiente a un 706,4 μM trolox
2764 equivalentes / mL de muestra. Esto se relaciona con la alta actividad de
2765 inhibición obtenida en ensayo DPPH, correspondiente al 82,2%, siendo
2766 también el valor más alto de las 41 fracciones evaluadas para esta especie.
2767 Esta fracción fue analizada por UHPLC-MS-MS y se identificó que el
2768 principal pigmento presente en esta muestra podría ser el
2769 hidroxiantraquinoide damnacantal que presenta actividad antioxidante y
2770 anticancerígena¹¹⁴. En otras muestras de la misma especie se identificaron
2771 por UHPLC modo scan a las azafilonas N-glucosyl-rubropunctamine,
2772 atrososin H, monankarin, monascopiridin, monafilona y monascin, que

2773 presentan antecedentes de propiedad antioxidante entre otras actividades
2774 biológicas^{36,100,111,112}.

2775 Al comparar las curvas de las muestras con las del estándar de trolox, se
2776 puede observar que el efecto antioxidante es más prolongado, llegando a los
2777 100 min en casi todas las muestras. Esto es comparable a los valores más
2778 altos de concentración de trolox.

2779 Para el caso del reactivo trolox, como es un análogo de la vitamina E, su
2780 mecanismo antioxidante es por reducción del hidroxilo fenólico del anillo de
2781 cromano, cuya estructura se describe en la Ilustración 62.



2784

2785 *Ilustración 62 Estructura química reactivo trolox.*

2786

2787 Por otro lado, la naturaleza antioxidante de los pigmentos fúngicos se podría
2788 deber a la gran diversidad de policétidos, como azafilonas e
2789 hidroxiantraquinoides, según los resultados preliminares en UHPLC-MS.
2790 También puede existir influencia de los grupos fenólicos, presentes en los
2791 policétidos detectados. Debido a esto, los mecanismos de acción se

2792 complejizan, y pueden actuar además a nivel enzimático. También podrían
2793 actuar de manera combinada a través de la sinergia de mecanismos
2794 antioxidantes de distintas moléculas. En este caso, al parecer existen varias
2795 moléculas que tienen actividad antioxidante, unas más que otras, ya sea por
2796 la composición química o por la concentración dentro del extracto. En el
2797 fraccionamiento se observó que, por ejemplo, la muestra 3 de *P. murcianum*
2798 y la muestra 30 de *T. australis* presentan un alto valor ORAC. Esto puede
2799 deberse a que, estas muestras podrían presentar una mayor pureza de los
2800 compuestos con propiedad antioxidante, lo que se observa a través del
2801 análisis en HPLC, obteniendo cromatogramas con pigmentos más puros. Por
2802 otra parte, los extractos brutos de *P. murcianum* y *T. australis*, presentaron
2803 un menor valor ORAC. Esto puede ser, por el enmascaramiento de la
2804 actividad antioxidante, debido a la presencia de otros compuestos que pueden
2805 antagonizar dicha propiedad. Para esto, es necesario realizar más estudios que
2806 confirmen si el efecto antioxidante se debe a los pigmentos analizados o a
2807 otros metabolitos secundarios que pudieran estar presentes, como polifenoles
2808 o sesquiterpenos.

2809 Al comparar los ensayos DPPH y ORAC, se observa que el primero es más
2810 básico, ya que corresponde solamente a la capacidad de donar un electrón

2811 para estabilizar el radical libre DPPH⁴³. En el caso del ensayo ORAC,
2812 también se observa capacidad de donar un electrón, pero al radical AAPH.
2813 En este caso se mantiene un flujo constante de radicales peróxilos, los que
2814 están presente en la biología humana como en los fosfolípidos de
2815 membrana⁴⁴. De esta forma, se puede afirmar que el ensayo ORAC sería más
2816 representativo de las condiciones reales.

2817 En resumen, se puede afirmar que el ensayo ORAC logró evidenciar una alta
2818 propiedad antioxidante en las muestras evaluadas. Los valores más alto
2819 corresponden a la muestra 3 de *P. murcianum* que presentó un valor de
2820 2130,4 μM trolox equivalentes / mL y la muestra 30 de *T. australis* que
2821 presentó un valor de 706,4 μM trolox equivalentes / mL.

2822 Una vez descrita la caracterización química de los extractos fúngicos y se
2823 evidenciadas las propiedades antioxidantes que éstos presentan, se procedió
2824 al desarrollo de la formulación como ingrediente cosmético. Se propone la
2825 microencapsulación de los pigmentos, con el fin de obtener una formulación
2826 adecuada, que proteja y mejore la eficiencia de los pigmentos.

2827

2828 **8. Elaboración de microcápsulas por gelación iónica con vibración**
2829 **asistida.**

2830 La microencapsulación se utiliza ampliamente en aplicaciones industriales y
2831 permite otorgar protección y estabilidad a las sustancias que se están
2832 microencapsulando^{52,53,64}. En el presente estudio, se microencapsularon los
2833 pigmentos de las especies fúngicas *P. murcianum* y *T. australis* mediante la
2834 técnica de gelación iónica con vibración asistida por encapsulador B-390
2835 BÜCHI. De esta forma se obtuvieron microcápsulas híbridas de alginato de
2836 sodio, ácido hialurónico y quitosano. También se evaluó la compatibilidad
2837 de los pigmentos con otros ingredientes de uso cosmético en una
2838 formulación. Los parámetros iniciales del encapsulador se fijaron en base a
2839 las recomendaciones indicadas en el manual de operaciones del encapsulador
2840 BÜCHI B-390⁶⁹, tal como se indica en la Tabla 32.

2841

2842

2843

2844

2845 *Tabla 32 Parámetros iniciales ajustados en el microencapsulador.*

Parámetro	Valor
Diámetro de boquilla	200 μm
Frecuencia	900 Hz
Campo eléctrico	1200 V
Amplitud	3
Temperatura boquilla	-
Presión de flujo	300 mBar
Altura boquilla-baño iónico	13 cm

2846

2847 La concentración de alginato de sodio se eligió a partir de lo que describe el
2848 manual para ese tamaño de boquilla, lo que corresponde a 1,5% p/v. Para
2849 lograr la gelificación del alginato de sodio se utilizó como baño iónico una
2850 solución de cloruro de calcio al 0,2 M.

2851 De esta forma, se inició la primera prueba de formación de microcápsulas
2852 con el equipo que se muestra en la Ilustración 63.

2853

2854

2855

2856

2857

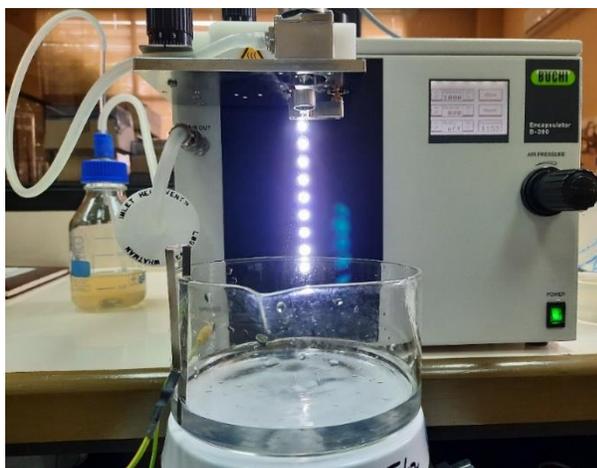
2858

2859

2860

2861

2862



2863

Ilustración 63 Encapsulador B-390 BÜCHI con la botella de presión que contiene la solución de alginato de sodio al 1,5% y el baño iónico con la solución de cloruro de calcio 0,2 M.

2864

2865

2866

2867

2868 En las primeras pruebas de encapsulación, no se lograron obtener

2869 microcápsulas, debido a que la solución de alginato de sodio al 1,5% resultó

2870 demasiado viscosa para pasar por la boquilla del equipo. Por lo que, se redujo

2871 la concentración de la solución de alginato de sodio al 1,2%, y se montó sobre

2872 una placa calefactora para mantener una temperatura entre 30-40°C. De esta

2873 forma se lograría disminuir la viscosidad de la solución polimérica. También

2874 se fijó una temperatura de 40°C para la boquilla, con el mismo fin. Con todos

2875 estos cambios, la solución de alginato de sodio si logró pasar a través de la

2876 boquilla, pero luego de transcurrido un tiempo de circulación de la solución,

2877 se obstruyó. Por esta razón, se optó por aumentar el diámetro de la boquilla
2878 a 300 μm , se mantuvo la solución inicial de alginato de sodio 1,5% y la
2879 temperatura de 40°C tanto en la solución de alginato de sodio como en la
2880 boquilla. A pesar de las modificaciones, la solución presentó un flujo
2881 irregular y se requirió de altas presiones 700-900 mbar. Bajo estas
2882 condiciones, la boquilla nuevamente se obstruyó. Para evitar la obstrucción
2883 de la boquilla se redujo la concentración de alginato de sodio a 1,3%, y solo
2884 se aumentó la presión de flujo a 527 mbar. Como se observa en la Ilustración
2885 64, con estas condiciones se logró un flujo constante de la solución
2886 polimérica, formando pequeñas gotas independientes que se depositaron
2887 homogéneamente en la solución iónica.

2888

2889

2890

2891

2892

2893

2894

2895

2896

2897

2898

2899

2900

2901

2902



2903

Ilustración 64 Chorro uniformemente aspersado en microencapsulador B-

2904

390.

2905

2906

En la Ilustración 65 se resumen las características de los microencapsulados

2907

obtenidos para la especie *P. murcianum*, junto a las cantidades de muestra,

2908

polímeros y los parámetros fijados en el encapsulador B-390.

2909

2910		PM4a Pigmentos:13,2 mg (caldo cultivo A); Alginato:1,3%; Cloruro de calcio dihidratado: 1,1% F:2110 Hz; E: 1100 V; P:228 mbar; F:18,0 mL/min; T:40,0°C; B:300 µm
2911		
2912		PM4b Pigmentos:26,4 mg (caldo cultivo A); Alginato:1,3%; Acido Hialurónico: 0,07%; Cloruro de calcio dihidratado: 1,5% F:800 Hz; E: 2500 V; P:396 mbar; F:10,0 mL/min; T:39,6°C; B:300 µm
2913		
2914		PM4c Pigmentos:79,2 mg (caldo cultivo A); Alginato:1,3%; Acido Hialurónico: 0,07%; Cloruro de calcio dihidratado: 2,9% F:1500 Hz; E: 2000 V; P:461 mbar; F:6,9 mL/min; T:40,3°C; B:300 µm
2915		PM4d Pigmentos:79,2 mg (caldo cultivo A); Alginato:1,3%; Acido Hialurónico: 0,07%; Cloruro de calcio dihidratado: 2,9% F:1500 Hz; E: 2000 V; P:482 mbar; F:6,0 mL/min; T:39,7°C; B:300 µm
2916		PM4e Pigmentos:79,2 mg (caldo cultivo A); Alginato:1,3%; Acido Hialurónico: 0,07%; Quitosano: 0,2%; Cloruro de calcio dihidratado: 2,9% F:1500 Hz; E: 2000 V; P:480 mbar; F:9,0 mL/min; T:40,3°C; B:300 µm
2917		
2918		PM5a Pigmentos:86,1 mg (caldo cultivo B); Alginato:1,3%; Acido Hialurónico: 0,07%; Quitosano: 0,2%; Cloruro de calcio dihidratado: 2,9% F:1500 Hz; E: 2300 V; P:400 mbar; F:10 mL/min; T:40,7°C; B:300 µm
2919		PM5b Pigmentos:86,1 mg (caldo cultivo B); Alginato:1,3%; Acido Hialurónico: 0,07%; Quitosano: 0,4%; Cloruro de calcio dihidratado: 2,9% F:1500 Hz; E: 2000 V; P:555 mbar; F:8,6 mL/min; T:40,3°C; B:300 µm
2920		PM5c Pigmentos:86,1 mg (caldo cultivo B); Alginato:1,3%; Acido Hialurónico: 0,07%; Quitosano: 0,2%; Cloruro de calcio dihidratado: 2,9% F:400 Hz; E: 2000 V; P:229 mbar; F:15,4 mL/min; T:40,1°C; B:450 µm
2921		
2922		PM5d Pigmentos:86,1 mg (caldo cultivo B); Alginato:1,8%; Acido Hialurónico: 0,07%; Quitosano: 0,2%; Cloruro de calcio dihidratado: 2,9% F:300 Hz; E: 2500 V; P:246 mbar; F:18,0 mL/min; T:39,9°C; B:450 µm

2923 *Ilustración 65 Polvos de microencapsulados obtenidos para P. murcianum.*

2924

2925 Para la especie *T. australis*, en la Ilustración 66 se resume los
 2926 microencapsulados obtenidos junto a las cantidades de muestra, polímeros y
 2927 los parámetros fijados en el encapsulador B-390.

2928		TA4a Pigmentos:7,35 mg (caldo cultivo A); Alginato:1,3%; Cloruro de calcio dihidratado: 1,1% F:2110 Hz; E: 1100 V; P:221 mbar; F:22,5 mL/min; T:40,0°C; B:300 μm
2929		TA4b Pigmentos:7,35 mg (caldo cultivo A); Alginato:1,3%; Acido Hialurónico: 0,07%; Cloruro de calcio dihidratado: 1,5% F:1200 Hz; E: 2300 V; P:390 mbar; F:7,5 mL/min; T:39,8°C; B:300 μm
2930		TA4c Pigmentos:58,8 mg (caldo cultivo A); Alginato:1,3%; Acido Hialurónico: 0,07%; Cloruro de calcio dihidratado: 2,9% F:1500 Hz; E: 2300 V; P:400 mbar; F:10 mL/min; T:40,7°C; B:300 μm
2931		TA4d Pigmentos:58,8 mg (caldo cultivo A); Alginato:1,3%; Acido Hialurónico: 0,07%; Cloruro de calcio dihidratado: 2,9% F:1500 Hz; E: 2300 V; P:478 mbar; F:5,6 mL/min; T:39,9°C; B:300 μm
2932		TA4e Pigmentos:58,8 mg (caldo cultivo A); Alginato:1,3%; Acido Hialurónico: 0,07%; Quitosano: 0,2%; Cloruro de calcio dihidratado: 2,9% F:1500 Hz; E: 2300 V; P:529 mbar; F:9,0 mL/min; T:39,6°C; B:300 μm
2933		TA5a Pigmentos:129,0 mg (caldo cultivo B); Alginato:1,3%; Acido Hialurónico: 0,07%; Quitosano: 0,2%; Cloruro de calcio dihidratado: 2,9% F:1500 Hz; E: 2300 V; P:422 mbar; F:8,0 mL/min; T:40,6°C; B:300 μm
2934		TA5b Pigmentos:129,0 mg (caldo cultivo B); Alginato:1,3%; Acido Hialurónico: 0,07%; Quitosano: 0,2%; Cloruro de calcio dihidratado: 2,9% F:700 Hz; E: 2300 V; P:462 mbar; F:8,2 mL/min; T:40,3°C; B:300 μm
2935		
2936		
2937		

2938 *Ilustración 66* Polvos de microencapsulados obtenidos para *T. australis*.

2939

2940

2941 En la Tabla 33 se detallan, los rendimientos alcanzados a partir de los
2942 distintos lotes obtenidos.

2943

2944 *Tabla 33 Rendimientos obtenidos en cada lote de microencapsulados.*

Lote	Masa total (mg)	Masa obtenida (mg)	Rendimiento (%)
PM4a	1181,9	758,8	64,2
PM4b	1256,8	1040,0	82,7
PM4c	1304,3	1096,5	84,1
PM4d	1304,3	1056,5	81,0
PM4e	1394,3	981,1	70,4
PM5a	1400,49	944,6	67,4
PM5b	1490,49	1077,5	72,3
PM5c	1400,49	843,1	60,2
PM5d	1850,5	1363,7	73,7
TA4a	1176,6	734,6	62,4
TA4b	1246,2	1021,3	82,0
TA4c	1285,9	1148,4	89,3
TA4d	1428,8	1286,4	90,0
TA4e	1375,9	1010,5	73,4
TA5a	1439,1	953,0	66,2
TA5b	1439,1	1009,4	70,1

2945

2946 Los resultados varían entre un 60 y un 90 % de rendimiento, destacando
2947 PM4c con un 84,1% y TA4d con un 90,0% que corresponden a los mayores
2948 rendimientos obtenidos para cada especie evaluada.

2949 Estos resultados son prometedores, ya que se obtuvieron microencapsulados
2950 de pigmentos fúngicos, que se presentan como un polvo de buen aspecto que
2951 pudiera ser incorporado a una formulación cosmética.

2952 Se propone para un estudio posterior hacer un diseño de experimentos para
2953 obtener los parámetros adecuados que permitan optimizar el proceso de la
2954 microencapsulación asistida.

2955

2956 **9. Determinación del color de las micropartículas de pigmentos fúngicos.**

2957 En el ser humano la visión del color está dada por el sistema óptico ocular el
2958 cual es muy complejo y la capacidad de discriminación del color no es igual
2959 en todo el espacio cromático. El color observado de un objeto depende de la
2960 energía espectral de la iluminación, las características de absorción del objeto
2961 y la sensibilidad visual del observador en el intervalo de luz visible¹¹⁵.

2962 Por este motivo es importante medir el color mediante instrumentos y
2963 técnicas basadas en la colorimetría⁷⁷. Con el fin de estandarizar el color de
2964 los polvos de pigmentos microencapsulados obtenidos, se calcularon las
2965 coordenadas CIE L*a*b* que se describen en la Tabla 34.

2966

2967 **Tabla 34** Determinación de color a través de la obtención de los factores

2968 CIE L*a*b*.

Lote	Masa (g)	L*	a*	b*	c*	h°
TA4d	0,44*	60,066	11,8856	8,8217	14,8017	36,5835
TA4e	0,68	54,4296	10,3607	5,4004	11,6837	27,5305
TA5a	0,64	57,4031	13,0927	8,0948	15,393	31,7273
TA5b	0,69	57,1855	13,8738	8,3703	16,2033	31,1033
PM4d	0,66	57,5019	4,408	7,4104	8,6223	59,2542
PM4e	0,53*	61,0393	4,9302	10,2235	11,3502	64,2549
PM5a	0,63	66,4477	2,8269	11,5485	11,8894	76,2454
PM5b	0,64	69,0348	2,6066	11,8668	12,1497	77,6113
PM5c	0,65	65,2782	3,0207	11,3176	11,7138	75,0559
PM5d	0,66	65,5650	3,0655	12,1997	12,5789	75,8948

2969 * No se disponía de más muestra.



2970

2971 En el caso de *T. australis*, la muestra TA4d corresponde a un
2972 microencapsulado que contiene el extracto bruto TA4 y cuya matriz
2973 polimérica es de alginato de sodio y ácido hialurónico, y la muestra TA4e
2974 contiene el mismo microencapsulado de extracto bruto, a la misma
2975 concentración, pero se le adiciona quitosano a la matriz polimérica, lo que
2976 genera una notoria variación en las coordenadas CIE L*a*b*.

2977 Las diferencias de color de las muestras que fueron evaluadas se describen
2978 en la Tabla 35.

2979 *Tabla 35. Diferencias de color entre muestras y lotes.*

Muestras comparadas	ΔE
TA4d-TA4e	6,8
TA4e-TA5a	4,9
TA5a-TA5b	0,9
PM4d-PM4e	4,5
PM4e-PM5a	6,0
PM5c-PM5d	1,3

2980

2981 Se observa una notoria disminución de la luminosidad (L) desde TA4d a
2982 TA4e, siendo por lo tanto este último lote más oscuro. Al calcular la
2983 diferencia de color entre estas dos muestras se obtiene un valor alto con
2984 respecto a la norma ISO 12647 que estandariza los colores dentro de las
2985 tecnologías gráficas, indicando con esto que el cambio de color es notorio
2986 tras la incorporación de quitosano ($\Delta E=6,8$). Ambas muestras tienen un matiz
2987 rojo bastante similar, lo que se ve reflejado en el valor de a^* . En el caso de
2988 b^* , este es mayor para TA4d. La diferencia de color entre las muestras TA4
2989 y TA5 también es significativa ($\Delta E=4,9$). En el caso de los lotes realizados a
2990 partir de TA5 (TA5a y TA5b), que presentan la misma matriz polimérica que
2991 TA4e, pero se modificaron parámetros en el microencapsulador entregando
2992 otras coordenadas CIE $L^*a^*b^*$ y cuya diferencia de color entre ambas
2993 muestras es mínima ($\Delta E=0,9$) en ambos casos las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$
2994 son muy similares entre sí siendo levemente más oscuro y rojo TA5b. La

2995 intensidad del matiz rojo aumenta en estas últimas muestras con respecto a
2996 los lotes obtenidos a partir del otro extracto bruto, lo que da cuenta de la
2997 diferencia en la composición y cantidad de los pigmentos entre ambos
2998 extractos, generando colores distintos.

2999 Para el caso de *P. murcianum* ocurre una situación similar, existe una notoria
3000 diferencia entre los lotes del extracto PM4, donde PM4d que presenta una
3001 matriz polimérica de alginato de sodio con ácido hialurónico, y el lote PM4e
3002 presenta la misma matriz polimérica más quitosano, lo que permite retener
3003 más pigmentos amarillos, generando un cambio en el color evidenciado en el
3004 valor calculado ($\Delta E=4,5$). En el caso de la luminosidad (L^*) esta aumenta con
3005 la adición de quitosano. Entre las muestras PM4 y PM5 se observa una
3006 notoria diferencia de color ($\Delta E=6,0$).

3007 A partir de PM5 se hicieron distintos lotes manteniendo la matriz polimérica
3008 de alginato, ácido hialurónico y quitosano, obteniendo coordenadas CIE
3009 $L^*a^*b^*$ más similares entre sí ($\Delta E=1,3$), que se traducen en un producto
3010 microencapsulado visualmente más homogéneo. En la Ilustración 67 se
3011 muestran los lotes evaluados y el tono calculado a partir de las coordenadas
3012 CIE $L^*a^*b^*$ para cada lote.



3021 *Ilustración 67* Polvos de microencapsulados que fueron evaluados por
 3022 *colorimetría.*

3023 Se observan diferencias en las coordenadas CIE L*a*b* en los distintos lotes,
 3024 en el caso de las últimas dos muestras para ambas especies, los valores se
 3025 estabilizan. Estas corresponden a las muestras que fueron seleccionadas,
 3026 porque presentaron una mayor estabilidad durante el proceso de formación
 3027 de las microcápsulas, estas corresponden a los lotes TA5a, TA5b, PM5c y
 3028 PM5d.

3029 Estos resultados nos entregan una primera aproximación al color que se
3030 puede obtener con los pigmentos microencapsulados. Si bien los valores de
3031 las coordenadas dan cuenta de un color poco intenso, esto se puede mejorar
3032 en ensayos a futuro. Por ejemplo, se podría producir un mayor número de
3033 lotes para asegurarnos la homogeneidad de los resultados por un lado y tener
3034 una mayor cantidad de muestra que permita la obtención de colores más vivos
3035 y brillantes.

3036

3037 **10. Análisis de la morfología de las micropartículas mediante**
3038 **microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.**

3039 Las herramientas microscópicas contribuyen en gran medida con el
3040 monitoreo de procesos relacionados a la micro-tecnología. Estos pueden
3041 revelar información importante, que permite guiar la utilización de un
3042 determinado método, materia prima, reactivo, etc⁸¹. Es por esto, que en esta
3043 sección se describe como las microfotografías permitieron apoyar el proceso
3044 de elaboración para encontrar la mejor formulación.

3045 La Ilustración 68 muestra una fotografía de las microcápsulas sumergidas en
3046 el baño iónico una vez formadas.

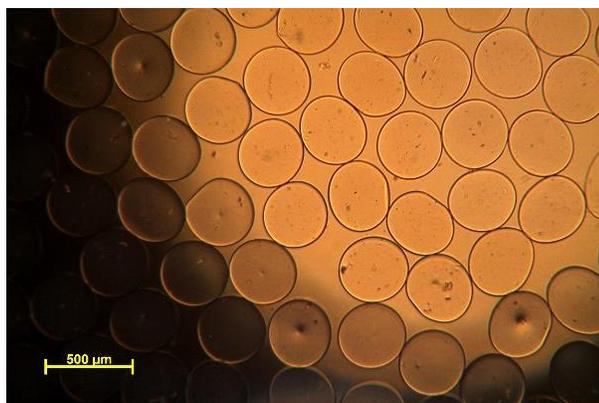
3047

3048

3049

3050

3051



3052

Ilustración 68 Micropartículas obtenidas directamente del baño iónico en el proceso de microencapsulación.

3053

3054

Las microcápsulas recién formadas, se observaron al microscopio óptico y se

3055

ven esféricas y de tamaños homogéneos. Luego fueron recolectadas desde la

3056

solución iónica mediante filtración, para luego ser secadas a temperatura

3057

ambiente en un desecador al vacío. La observación macroscópica de las

3058

partículas secas se aprecia en la Ilustración 69.

3059

3060

3061

3062

3063

3064

3065

3066

3067



3068

Ilustración 69 Aglomerados de microcápsulas secadas a temperatura ambiente en desecador al vacío.

3069

3070

3071 La microcápsulas secadas a temperatura ambiente, se observan aglomeradas,
3072 fuertemente unidas en muchos casos, dificultando su separación.

3073 Otro de los métodos de secado evaluado, fue la liofilización, donde se obtiene
3074 un polvo de mejor aspecto y con poca aglomeración, como se observa en la
3075 Ilustración 70.

3076

3077

3078

3079

3080

3081

3082

3083



Ilustración 70 Polvo de microcápsulas secadas por liofilización.

3084

3085 En la Ilustración 71, se muestra una microfotografía obtenida por SEM de

3086 una muestra del polvo de microcápsulas secadas por liofilización.

3087

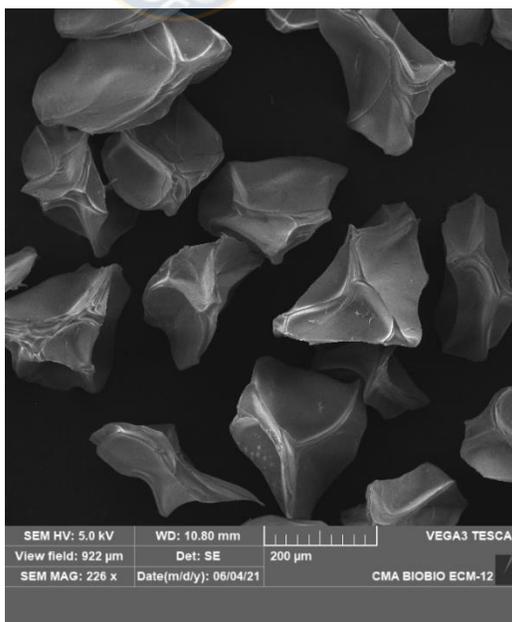
3088

3089

3090

3091

3092



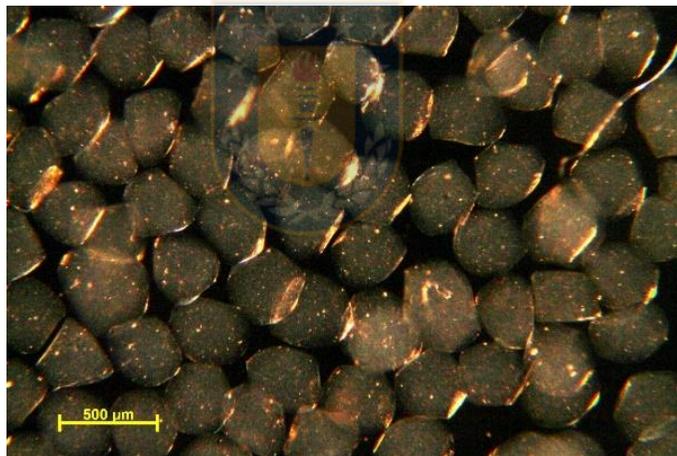
3093

Ilustración 71 Microfotografía por SEM de microcápsulas sin pigmentos.

3094 Se observa que las microcápsulas pierden la forma esférica regular, que se
3095 observa cuando están recién formadas, y obtienen una forma irregular. Esto
3096 puede deberse a que las drásticas condiciones del método de secado
3097 (liofilización) colapsaron la estructura polimérica.

3098 Las muestras fueron rehidratadas por 1 hr. aproximadamente, en la
3099 Ilustración 72 se muestra una microfotografía de las microparticulas luego de
3100 este proceso.

3101



3102

3103

3104

3105

Ilustración 72 Micropartículas rehidratadas obtenidas por el proceso de gelación iónica con vibración asistida por encapsulador.

3106

3107

3108 Tras ser rehidratadas las microcápsulas recuperaron, de manera parcial, la
3109 forma esferoidal inicial, esto indica un posible colapsamiento de la estructura
3110 polimérica inicial tras el secado por liofilización. Para conocer más detalle

3111 de la estructura se utilizó microscopía de barrido, ya que entrega una mejor
3112 imagen de la forma y estructura de las microcápsulas en una muestra seca. Se
3113 observan partículas de forma esferoidal irregular, como se muestra en la
3114 Ilustración 73, si se realiza acercamiento se ve la disposición de las fibras de
3115 los polímeros.

3116

3117

3118

3119

3120

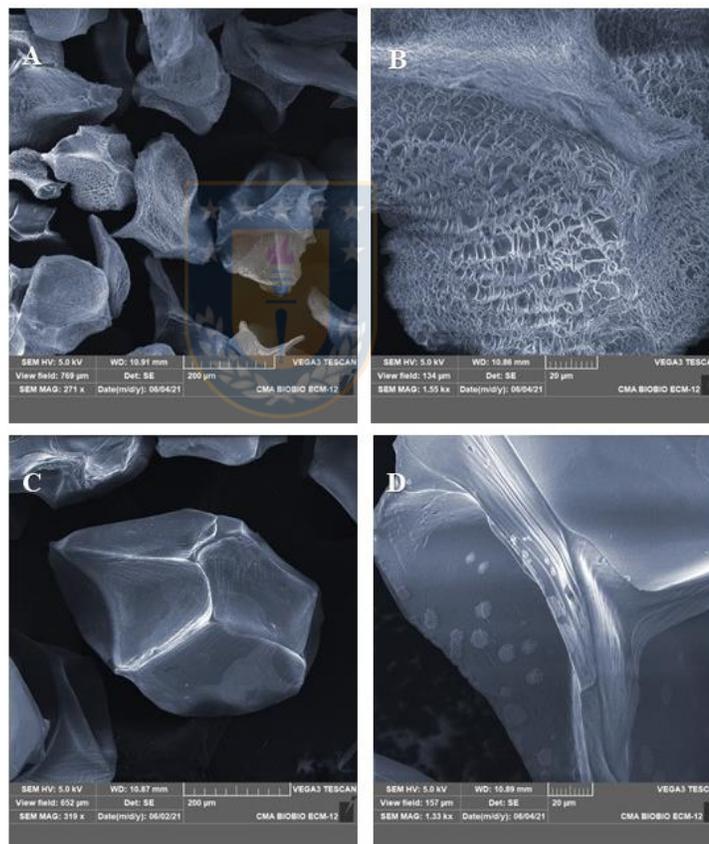
3121

3122

3123

3124

3125



3126

Ilustración 73 Microfotografías en microscopio electrónico de barrido para micropartículas liofilizadas.

3127

3128 En los ensayos con las microcápsulas cargadas de pigmentos se obtuvieron
3129 distintos lotes, los que se describen y analizan, complementando con
3130 herramientas microscópicas.

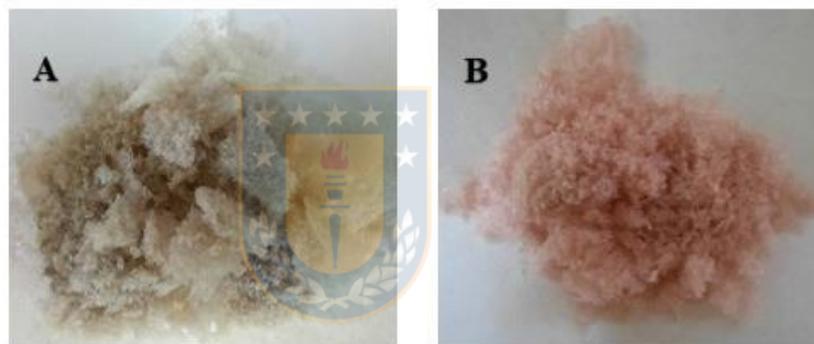
3131 Para los primeros lotes, PM4a y TA4a, que solo contienen alginato de sodio
3132 como polímero, se observa aglomeración en el polvo seco liofilizado, esto se
3133 observa en la Ilustración 74.

3134

3135

3136

3137



3138 *Ilustración 74* Polvo seco de microencapsulados de los lotes (A) PM4a;
3139 (B) TA4a.

3139

3140 Este polvo fue examinado por SEM, y las microfotografías se detallan en la
3141 Ilustración 75.

3142

3143

3144

3145

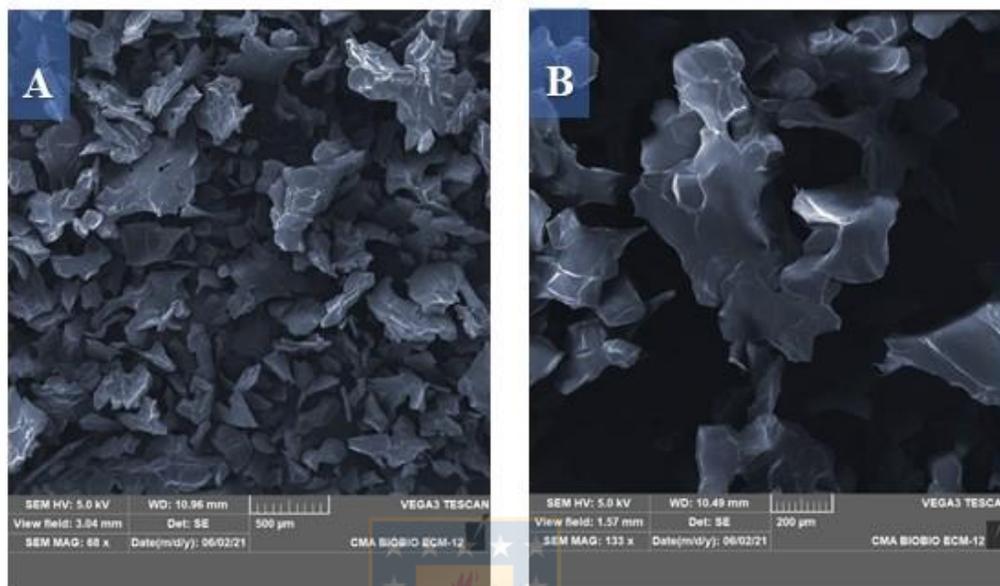
3146

3147

3148

3149

3150



3151

Ilustración 75 Microfotografías en microscopio electrónico de barrido para

3152

micropartículas liofilizadas de los lotes (A) PM4a; (B) TA4a.

3153

3154 A través de la microscopía se ve gran aglomeración de micropartículas,

3155

llevando a la fusión de estas, como se observa en la Ilustración 76.

3156

3157

3158

3159

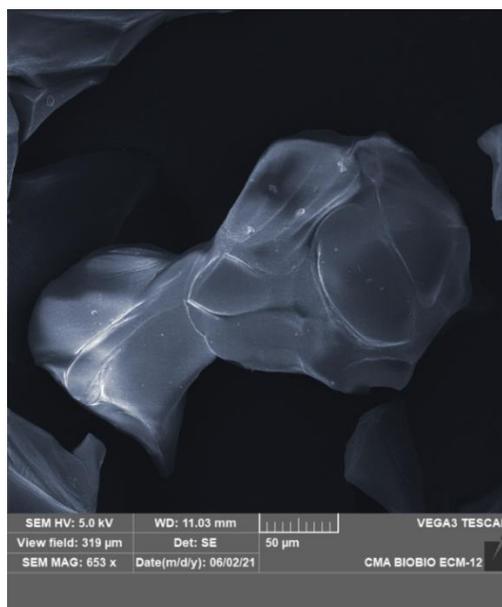
3160

3161

3162

3163

3164



3165

Ilustración 76 Microfotografía en microscopio electrónico de barrido para micropartículas liofilizadas de T. australis (TA4a).

3166

3167

3168 Que las microcápsulas se aglomeren y en muchos casos se fusionen, puede

3169 ser una desventaja para la masa de polvos de microencapsulados, la cual se

3170 quiere aplicar a la industria cosmética. Esto debido a que esta masa de

3171 microcápsulas aglomeradas, podría tener inconvenientes para

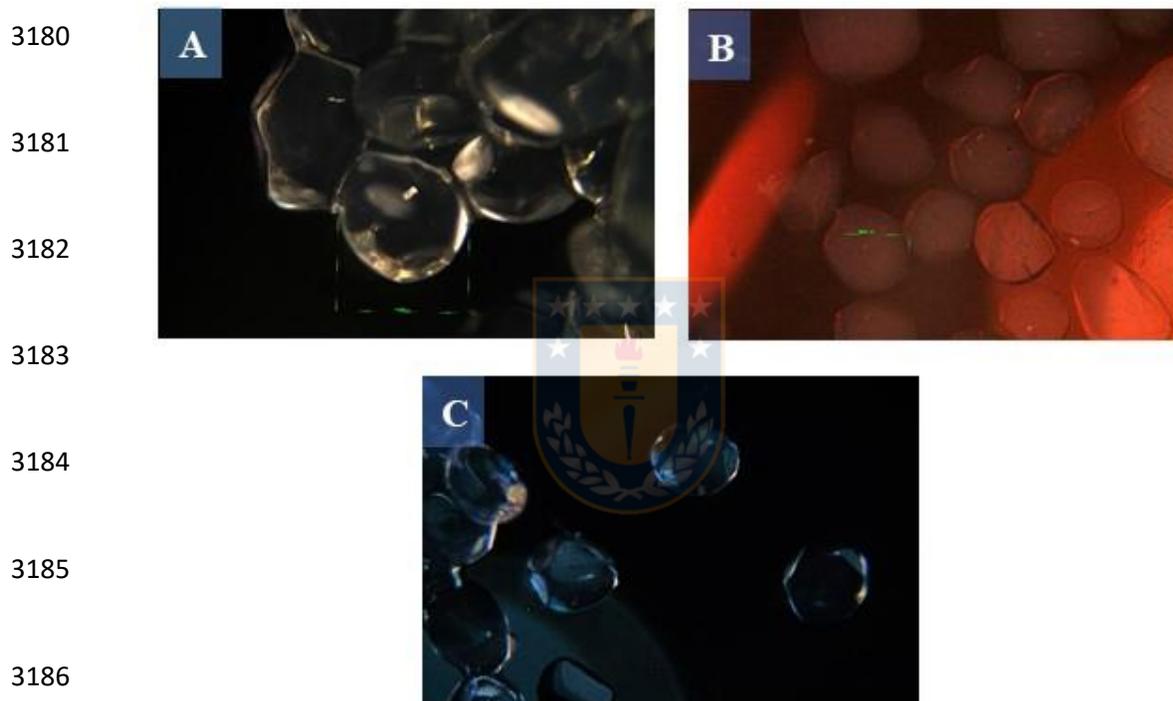
3172 homogeneizarse dentro de una formulación cosmética. Con la finalidad de

3173 reducir la aglomeración de la masa de polvos de microencapsulados⁶⁸ y

3174 otorgar a la formulación otros atributos a nivel cosmético, se incorporó ácido

3175 hialurónico a la formulación. Para esto, se realizaron pruebas con distintas

3176 concentraciones de ácido hialurónico dentro de la solución polimérica. Las
3177 concentraciones se establecieron según antecedentes encontrados en la
3178 literatura⁷⁶. Las microcápsulas formadas se observaron por microscopia
3179 óptica y las microfotografías se detallan en la Ilustración 77.



3187 *Ilustración 77* Microfotografías de micropartículas híbridas de alginato y
3188 ácido hialurónico, (A)= 1% Alg : 0,07% AH; (B)= 1,3% Alg : 0,07% AH;
3189 (C)= 1,3% Alg : 0,035% AH.

3190 Aunque no se observa una notoria diferencia entre las distintas
3191 concentraciones, fue seleccionada la muestra C que contiene 1300 mg de

3192 alginato de sodio y 35 mg de ácido hialurónico. Una ventaja que se observó
3193 con la adición de ácido hialurónico, fue la disminución de la aglomeración
3194 de las micropartículas, lo cual está descrito en bibliografía según Athamneh
3195 *et al* 2019. Esto se observa en el aspecto de los polvos de microencapsulados
3196 detallados en la Ilustración 78.



3202

Ilustración 78 Polvos liofilizados de microencapsulados de los lotes PM4a y

3203

PM4b; (B) TA4a y TA4b.

3204

3205 Se aumentó la concentración del extracto de pigmentos, para que los
3206 microencapsulados fueran más coloreados. Esto se observa en la Ilustración
3207 79.

3208

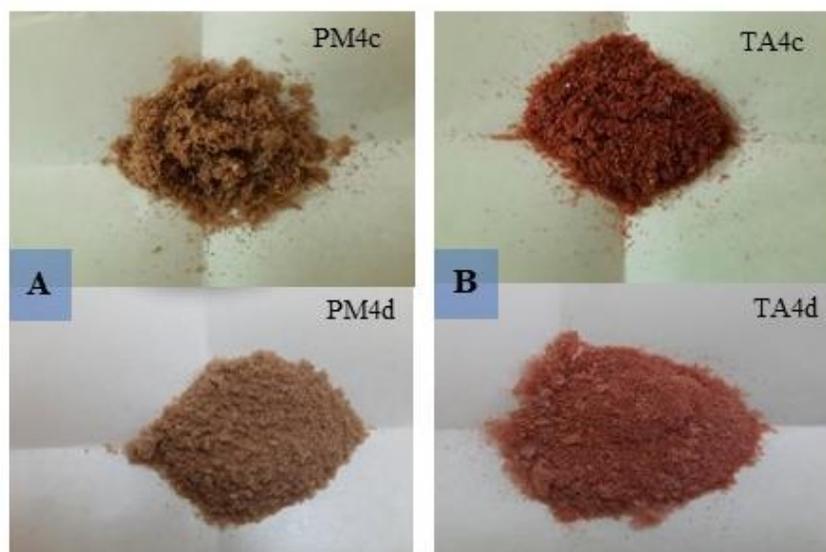
3209

3210

3211

3212

3213



3214

Ilustración 79 Polvos liofilizados de microencapsulados de los lotes (A)

3215

PM4c; PM4d y (B) TA4c y TA4d.

3216

Se observa una baja retención de los pigmentos al medir la eficiencia de

3217

encapsulación, por lo que se propone adicionar otro polímero que contribuya

3218

a mejorar la retención. Para esto se podría utilizar un polímero de carga

3219

positiva que estabilizará las cargas negativas del alginato de sodio y el ácido

3220

hialurónico. Se propone el polímero de carga positiva quitosano, debido a su

3221

biodegradabilidad y biocompatibilidad, al igual que el alginato y el ácido

3222

hialurónico, por lo que, presentan amplias aplicaciones farmacéuticas

3223

otorgando un enfoque sustentable⁶⁶.

3224 Por lo que, el quitosano podría ser una gran alternativa para estabilizar la
3225 micropartícula. Debido a que, el quitosano se adicionaría formando un
3226 complejo polielectrolito⁷⁵, como se observa en la Ilustración 80.

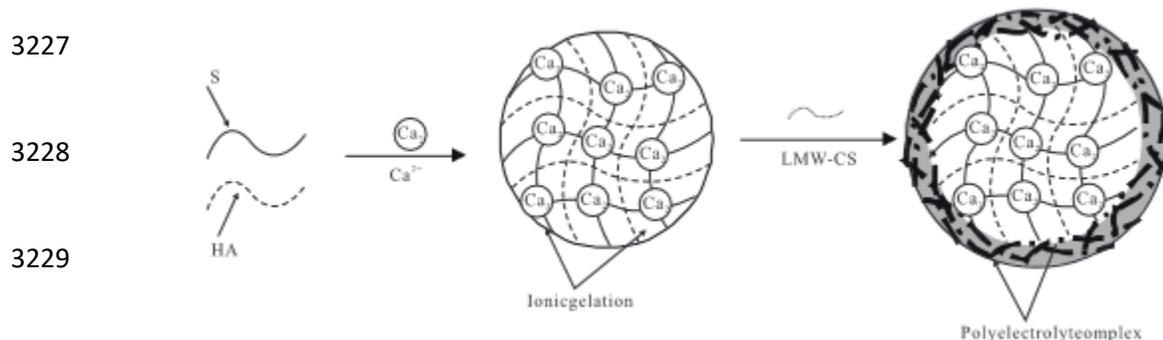


Ilustración 80 Esquema de formación de micropartículas de alginato/ácido hialurónico/quitosano⁷¹.

3233 Debido a esto, se adicionó 100 mg de quitosano 0,2% al baño iónico y se
3234 realizó el mismo procedimiento de microencapsulación desarrollado hasta
3235 este punto. A continuación, en la Ilustración 81 se muestran los distintos
3236 polvos liofilizados obtenidos a partir de la incorporación de este polímero.

3237

3238

3239

3240

3241

3242

3243

3244

3245

3246

3247

3248

3249

3250

3251

3252

3253

3254

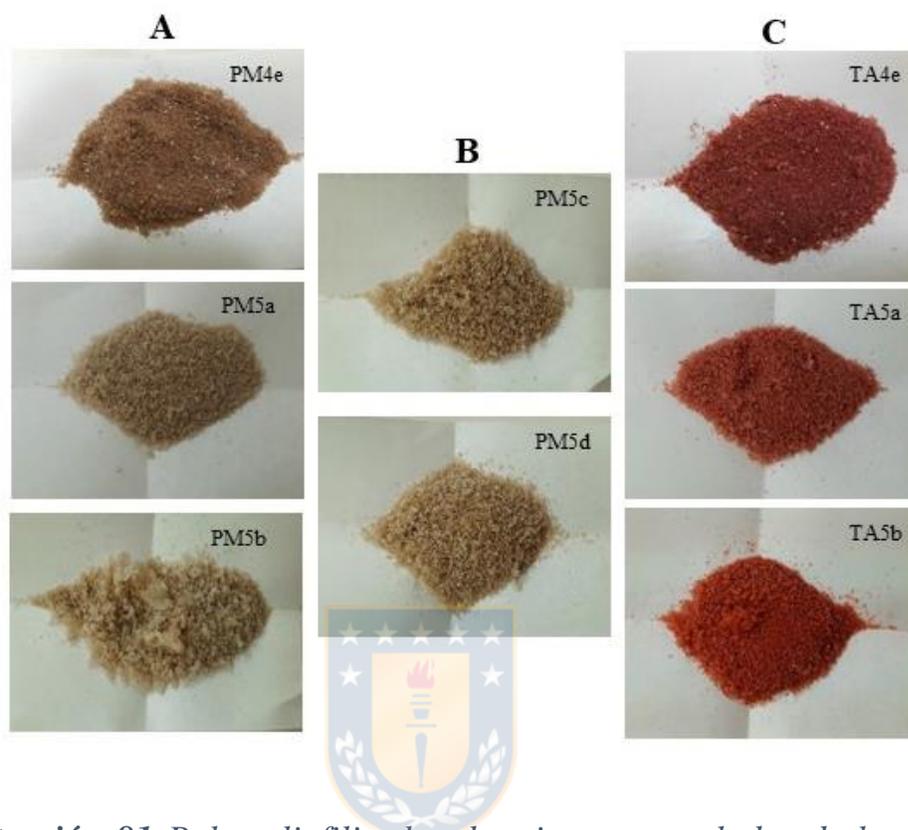


Ilustración 81 Polvos liofilizados de microencapsulados de los lotes (A)

PM4e; PM5a; PM5b; (B) PM5c; PM5d; (C) TA4e; TA5a; TA5b.

En este caso, se observó que el polvo liofilizado presentaba una tonalidad más intensa para *T. australis*, lo que posiblemente indicaría una mayor retención de los pigmentos. Sin embargo, en las muestras de *P. murcianum* el polvo se ve un poco más claro, lo que se puede deber al tipo de extracto utilizado. Esto debido a que se observa una notoria diferencia de color entre

3255 las muestras derivadas del extracto PM4 y PM5, lo que puede estar
3256 relacionado a una distinta composición de pigmentos.

3257 A continuación, se describen con mayor profundidad las muestras
3258 seleccionadas para cada especie. Las micropartículas del lote PM4e,
3259 contienen en su matriz polimérica, alginato, ácido hialurónico y quitosano, a
3260 partir del polvo liofilizado se tomó una muestra para analizar al microscopio.
3261 Los pigmentos de *P. murcianum* le otorgan una coloración amarilla, la que
3262 es captada por microscopía óptica como se observa en la Ilustración 82.

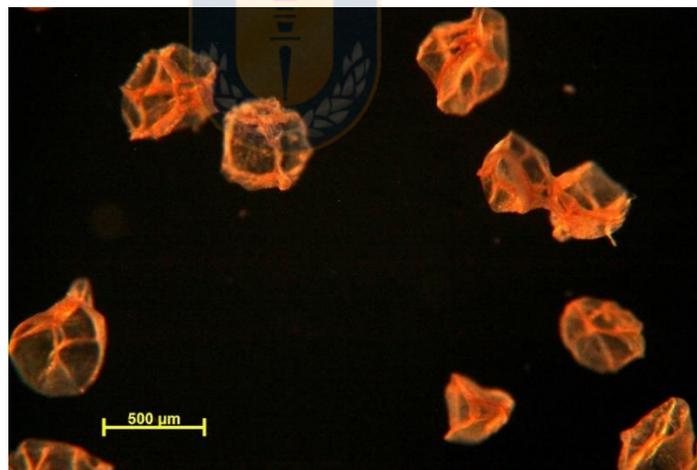
3263

3264

3265

3266

3267



3268 *Ilustración 82* Microfotografía en microscopio óptico con aumento 4X
3269 para muestra liofilizada de *P. murcianum* (PM4e).

3270

3271 En la Ilustración 83 se observa la imagen de una muestra de polvo liofilizado
3272 de PM4e, a través de un microscopio electrónico de barrido.

3273

3274

3275

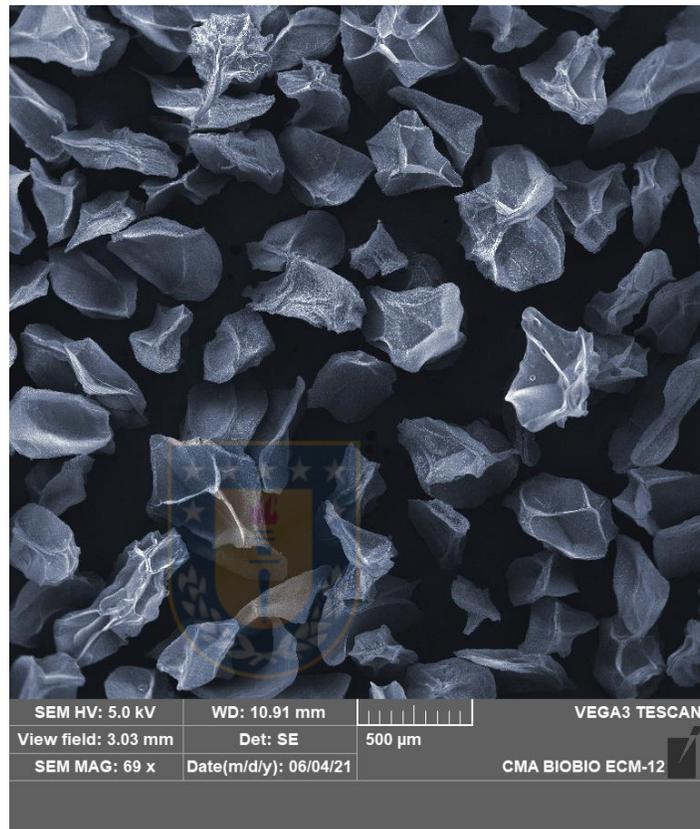
3276

3277

3278

3279

3280



3281

Ilustración 83 Microfotografía en microscopio electrónico de barrido para

3282

muestra liofilizada de P. murcianum (PM4e).

3283

3284 Con el SEM se otorgó una mayor profundidad a la imagen, entregando más

3285 información sobre la estructura de las micropartículas. Esto debido a que se

3286 obtienen distintos planos, asimilando la estructura tridimensional de las

3287 micropartículas. Otro detalle que destaca, es que se observan algunas zonas
3288 más brillantes que otras, dentro de las micropartículas, esto podría ser a causa
3289 de que algunos de los compuestos pueden fluorescer.

3290 Otra muestra seleccionada corresponde al lote TA4e, que corresponde a
3291 microencapsulados de pigmentos de *T. australis*. En la Ilustración 84 se
3292 observa, a través de microscopía óptica, que las micropartículas presentan
3293 pigmentos que le otorgan una coloración rojiza.

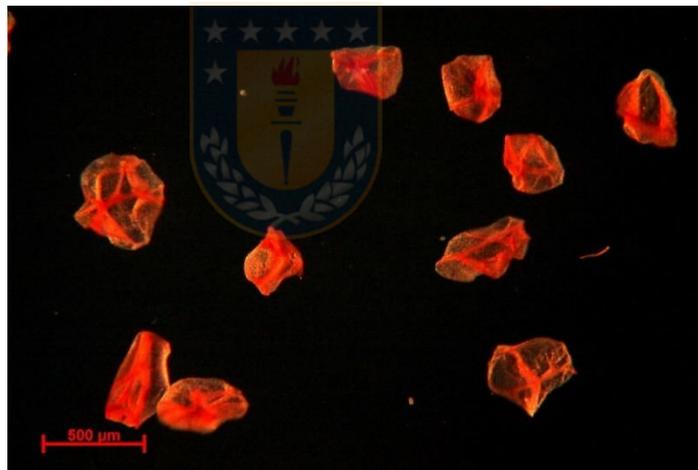
3294

3295

3296

3297

3298



3299 **Ilustración 84** Microfotografía en microscopio óptico con aumento 4X para
3300 muestra liofilizada de *T. australis* (TA4e).

3300

3301

3302 En la Ilustración 85 se muestra la imagen del lote TA4e, a través de un
3303 microscopio electrónico de barrido.

3304

3305

3306

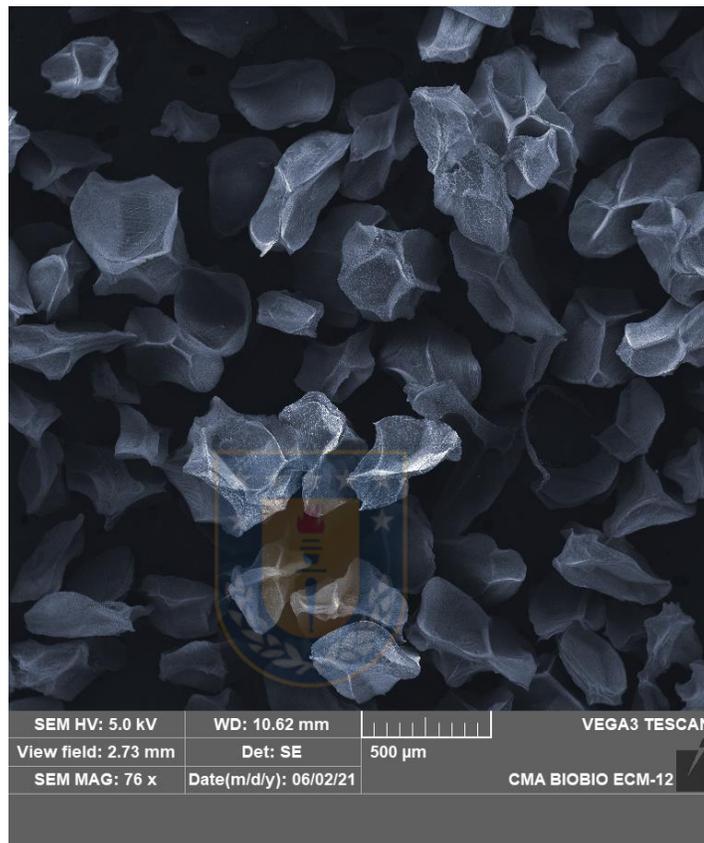
3307

3308

3309

3310

3311



3312

3313

3314

Ilustración 85 Microfotografía en microscopio electrónico de barrido para muestra liofilizada de *T. australis* (TA4e).

3315

3316

Al igual que lo indicado para la muestra anterior, se observan zonas más brillantes que pueden relacionarse a la presencia de pigmentos fluorescentes.

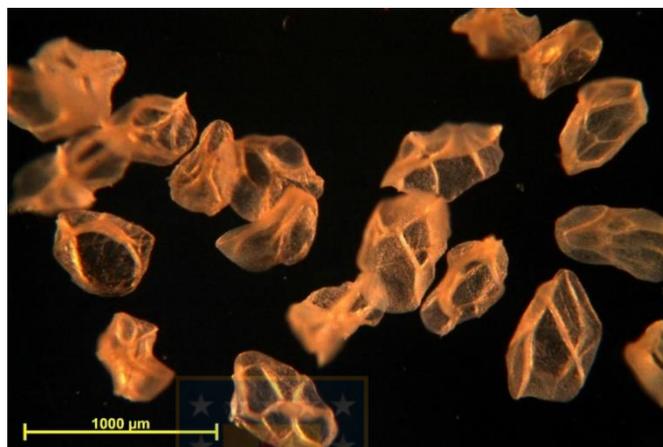
3317 Otra muestra analizada corresponde a las micropartículas del lote PM5c, la
3318 cual presenta pigmentos de *P. murcianum*, que le otorgan una coloración
3319 amarilla como se observa en la Ilustración 86.

3320

3321

3322

3323



3324

3325 *Ilustración 86* Microfotografía en microscopio óptico con aumento 4X para
3326 muestra liofilizada de *P. murcianum* (lote PM5c).

3327

3328 En este caso se observan micropartículas ligeramente más grandes, lo que se
3329 relaciona al tamaño de boquilla utilizado.

3330 En la Ilustración 87 se observa la imagen del lote PM5c, a través de un
3331 microscopio electrónico de barrido.

3332

3333

3333

3334

3335

3336

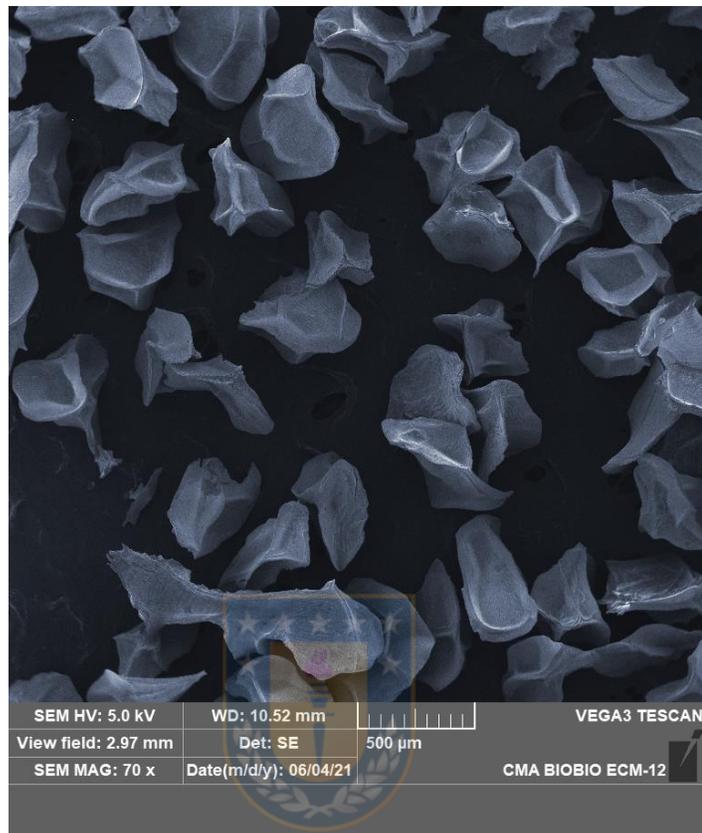
3337

3338

3339

3340

3341



3342

Ilustración 87 Microfotografía en microscopio electrónico de barrido para muestra liofilizada de *P. murcianum* (lote PM5c).

3343

3344 En este caso también se observan zonas más brillantes que pueden
3345 relacionarse a la presencia de pigmentos fluorescentes.

3346

3347 La última muestra analizada corresponde a las micropartículas del lote TA5b,
3348 cuyos pigmentos de *T. australis* le otorgan una coloración rojiza como se
3349 observa en la Ilustración 88.

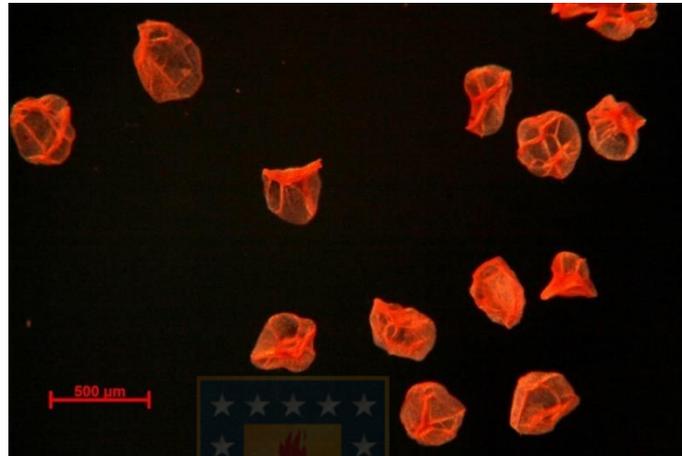
3350

3351

3352

3353

3354



3355

3356

Ilustración 88 Microfotografía en microscopio óptico con aumento 4X para muestra liofilizada de *T. australis* (lote TA5b).

3357

3358 Para este caso las micropartículas se ven más homogéneas en tamaño y
3359 forma. Para analizar más detalladamente la estructura, se observó la muestra
3360 a través de SEM como se muestra en la Ilustración 89.

3361

3362

3363

3364

3365

3366

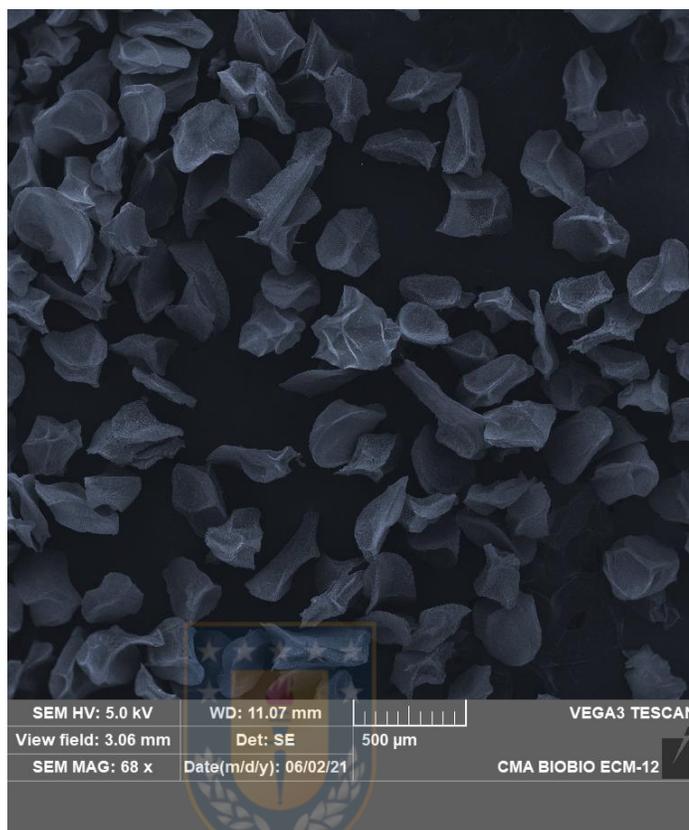
3367

3368

3369

3370

3371



3372

Ilustración 89 Microfotografía en microscopio electrónico de barrido para muestra liofilizada de *T. australis* (lote TA5b).

3373

3374

3375 En este caso la microscopía óptica aportó en el monitoreo rutinario de los
3376 experimentos realizados para obtener microencapsulados. Por otro lado, la
3377 microscopía de barrido permitió un análisis más detallado de la forma y
3378 estructura de muestras seleccionadas. La forma observada en todos los lotes
3379 elaborados fue irregular. A partir de esto, según la USP para definir la forma

3380 de partículas irregulares, se describiría a las microcápsulas obtenidas, con una
3381 forma irregular de cubo o esfera⁷⁹. Esto quiere decir que son partículas de
3382 largo, ancho y espesor de dimensiones similares. Además, se observa en
3383 algunos casos bordes filosos y superficies punteada (con pequeñas
3384 hendiduras)⁷⁹. Esto se puede deber al colapsamiento de la estructura
3385 polimérica durante el secado de la microcápsula. Con respecto al tamaño, en
3386 una sección de más adelante, se realiza un análisis de distribución de tamaños
3387 por microscopía óptica. Pero con una revisión general de las muestras,
3388 estarían clasificadas como partículas de tamaño intermedio (75-1000 μm)
3389 para procesos farmacéuticos. Con respecto a la clasificación de los polvos
3390 según su finura estos podrían estar clasificados como grueso (d_{50} abertura de
3391 tamiz=355-1000 μm). Para determinar esto, se requeriría hacer un tamizaje
3392 de la muestra, lo que en este caso se complica, porque las cantidades de
3393 muestra con que se trabaja son muy bajas¹¹⁶.

3394 A partir de las herramientas microscópicas se puede obtener información de
3395 utilidad para monitorear un proceso sobre todo si se trabaja con micro-
3396 tecnología.

3397 **11. Análisis de distribución de tamaño de las micropartículas mediante**
3398 **microscopia óptica.**

3399 La granulometría es una herramienta muy utilizada que permite la evaluación
3400 del tamaño, forma y distribución de tamaño de partículas constituyentes de
3401 un sistema sólido pulverulento⁸¹. Por lo que, para contribuir con antecedentes
3402 granulométricos, se realizó un análisis de la distribución de tamaño a través
3403 de microscopia óptica. De esta forma, se obtuvieron valores de diámetros de
3404 micropartículas, las que fueron analizadas en tablas de distribución de
3405 frecuencias. La primera muestra analizada fue la del lote PM4e, cuyos datos
3406 de distribución de frecuencias se detallan en la Tabla 36.

3407

3408

3409

3410

3411

3412 *Tabla 36 Distribución de frecuencias de tamaños de micropartículas de P.*
 3413 *murcianum (lote PM4e).*

Intervalo	Diámetro medio (d)	Frecuencia (n)	n*d	n*d ²	n*d ³	Frec. porcentual	Frec. porc. acum.
[235,15-316,41]	275,78	19	5239	1445037	398512458	6,31	6,31
[316,42-397,73]	357,08	72	25709	9180441	3278151908	23,92	30,23
[397,74-479,05]	438,40	95	41647	18258066	8004245161	31,56	61,79
[479,06-560,37]	519,72	62	32222	16746428	8703369951	20,60	82,39
[560,38-641,69]	601,04	33	19834	11921021	7164951067	10,96	93,36
[641,70-723,01]	682,36	12	8188	5587300	3812522195	3,99	97,34
[723,02-804,33]	763,68	5	3818	2915997	2226874412	1,66	99,00
[804,34-885,65]	844,99	3	2534	2142024	1809989114	1,00	100,00
SUMATORIAS		301	13919	68196316	35398616266	100,00	-

3414

3415 En el histograma obtenido para PM4e se observa una distribución de tamaño
 3416 no normal como se detalla en la Ilustración 90.

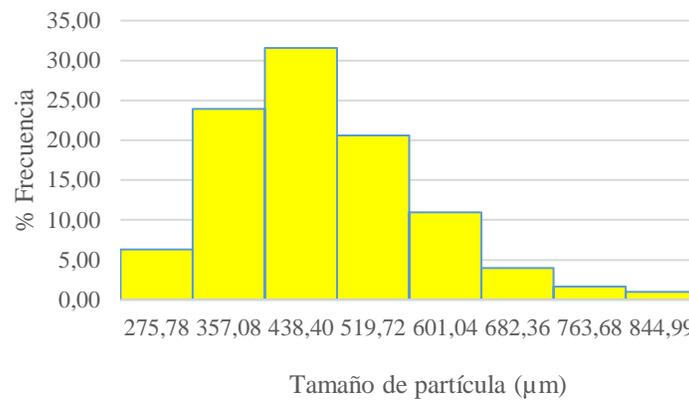
3417

3418

3419

3420

3421



3422

3423

3424

3425

Ilustración 90 Histograma de Frecuencias de tamaños de las micropartículas de P. murcianum (lote PM4e).

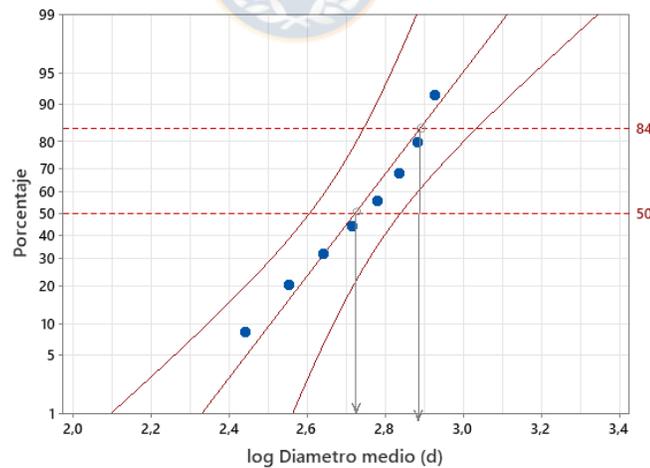
3426

3427

Como la distribución de tamaños es asimétrica, se requiere normalizar a través de un gráfico de probabilidad, como se detalla en la Ilustración 91.

3428

3429



3430

3431

3432

3433

3434

Ilustración 91 Gráfico de probabilidad para log de diámetro medio y frecuencia porcentual acumulada en las micropartículas de P. murcianum (PM4e).

3435

3436 De esta forma, se obtienen los valores $d_{50\%}$ y $d_{84\%}$, a partir de esto la
3437 desviación estándar geométrica y con ello se pueden realizar los cálculos de
3438 los diámetros aritméticos. En la Tabla 37 se reúnen los valores de diámetro
3439 medio (DAV), superficie media (DS), volumen medio (DV) y razón
3440 volumen/superficie (DVS).

3441

3442 *Tabla 37 Diámetros geométricos y estadísticos para las micropartículas de*
3443 *P. murcianum (lote PM4e).*



Diámetros	Geométricos (μm)	Estadísticos (μm)
DAV	462,44	526,20
DVS	519,07	534,16
DS	475,99	528,18
DV	489,94	530,16

3444

3445 La segunda muestra seleccionada corresponde al lote TA4e cuyos datos de
3446 distribución de frecuencias se detallan en la Tabla 38.

3447

3448

3449 *Tabla 38 Distribución de frecuencias de los tamaños de las micropartículas*
 3450 *de T. australis (TA4e).*

Intervalo	Diámetro medio (d)	Frecuencia (n)	n*d	n*d ²	n*d ³	Frec porcentua l	Frec. porc. acumulada
[218,06-272,18]	245,12	15	3676	901257	220916169	4,90	4,90
[272,19-326,37]	299,28	56	16759	5015837	1501139706	18,30	23,20
[326,38-380,50]	353,44	79	27921	9868666	3487981613	25,82	49,02
[380,51-434,63]	407,57	68	27714	11295704	4603790378	22,22	71,24
[434,64-488,76]	461,70	56	25855	11937345	5511472574	18,30	89,54
[488,77-542,89]	515,83	17	8769	4523370	2333289953	5,56	95,10
[542,90-597,02]	569,96	9	5129	2923689	1666386133	2,94	98,04
[597,03-651,15]	624,09	6	3744	2336929	1458454624	1,96	100,00
SUMATORIAS		306	119571	48802801	20783431150	100,00	-

3451

3452 En el histograma obtenido para TA4e se observa una distribución de tamaño
 3453 no normal como se detalla en la Ilustración 92.

3454

3455

3456

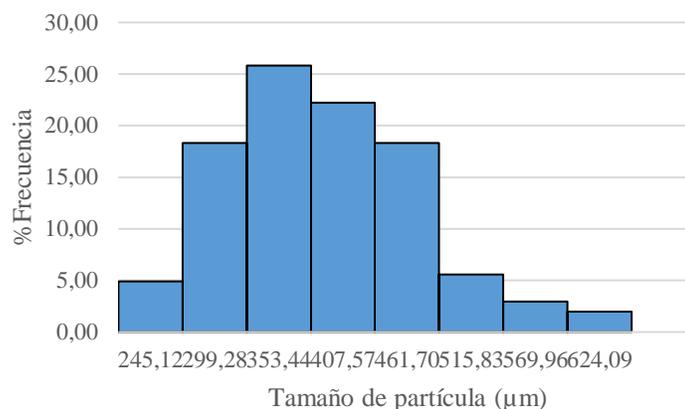
3457

3458

3459

3460

3461



3462

Ilustración 92 Histograma de frecuencias de tamaños de las

3463

micropartículas de T. australis (TA4e).

3464

Como la distribución de tamaños es asimétrica, se normalizó a través de un

3465

gráfico de probabilidad, que permite obtener los valores $d_{50\%}$ y $d_{84\%}$, como se

3466

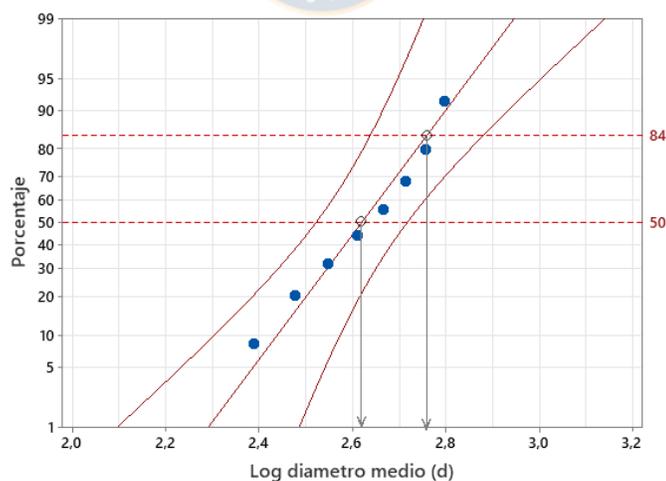
observa en la Ilustración 93.

3467

3468

3469

3470



3471

Ilustración 93 Gráfico de probabilidad para log de diámetro medio y

3472

frecuencia porcentual acumulada de las micropartículas de T. australis (lote

3473

TA4e).

3474 De esta forma, se puede obtener el valor de la desviación estándar geométrica
3475 y con ello realizar los cálculos de los diámetros aritméticos. En la Tabla 39
3476 se reúnen los valores de diámetro medio (DAV), superficie media (DS),
3477 volumen medio (DV) y razón volumen/superficie (DVS).

3478

3479 *Tabla 39 Diámetros geométricos y estadísticos para las micropartículas de*
3480 *T. australis (lote TA4e).*

Diámetros	Geométricos (μm)	Estadísticos (μm)
DAV	390,76	437,84
DVS	425,87	536,61
DS	399,36	460,69
DV	408,00	484,71

3481

3482 Al analizar los resultados se observa que para ambas muestras los
3483 histogramas no tienen una distribución normal, esto debido a que la
3484 distribución de tamaño es muy amplia. Esta desigualdad en el tamaño de las
3485 micropartículas formadas puede deberse a la inestabilidad que presentó el
3486 chorro en aspersion. Posiblemente debido a la utilización de una frecuencia
3487 muy alta en los parámetros del microencapsulador. Por esta razón, se
3488 realizaron nuevos lotes de micropartículas, disminuyendo la frecuencia del
3489 microencapsulador al valor de 400 Hz para *P. murcianum* y 700 Hz para *T.*

3490 *australis*. Por lo que, a partir de los nuevos lotes, se realizó un nuevo análisis
 3491 granulométrico. En primer lugar, a la muestra del lote PM5c, cuyos datos de
 3492 distribución de frecuencias se detallan en la Tabla 40.

3493

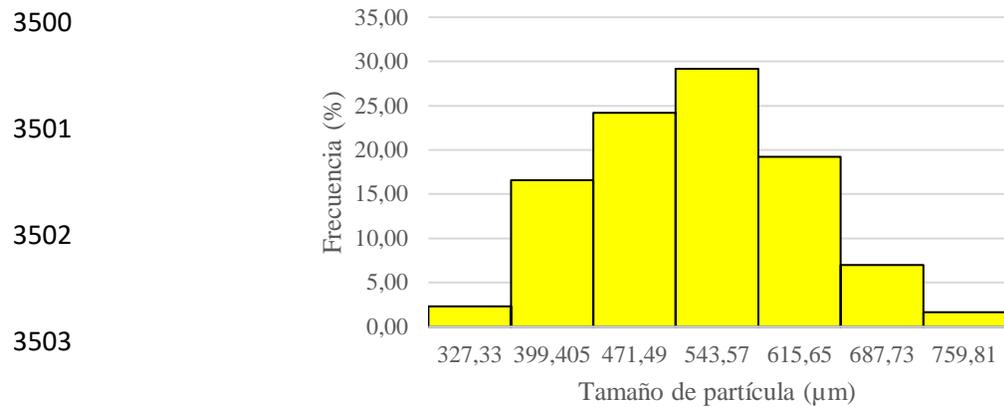
3494 **Tabla 40** Distribución de frecuencias de los tamaños de las micropartículas
 3495 de *P. murcianum* (lote PM5c).

Intervalo	Diámetro medio (d)	Frecuencia (n)	n*d	n*d ²	n*d ³	Frec. porcentual	Frec. porc. acum.
[291,29-363,36]	327,33	7	2291	749991	245490996	2,32	2,32
[363,37-435,44]	399,405	50	19970	7976217	3185741230	16,56	18,88
[435,45-507,52]	471,49	73	34418	16227761	7651146216	24,17	43,05
[507,53-579,60]	543,57	88	47833	26000736	14133090070	29,14	72,19
[579,61-651,68]	615,65	58	35707	21983088	13533778476	19,21	91,40
[651,69-723,76]	687,73	21	14442	9932279	6830676704	6,95	98,35
[723,77-795,84]	759,81	5	3799	2886518	2193190953	1,66	100,01
SUMATORIAS		302	158462	85756592	47773114649	100,01	-

3496

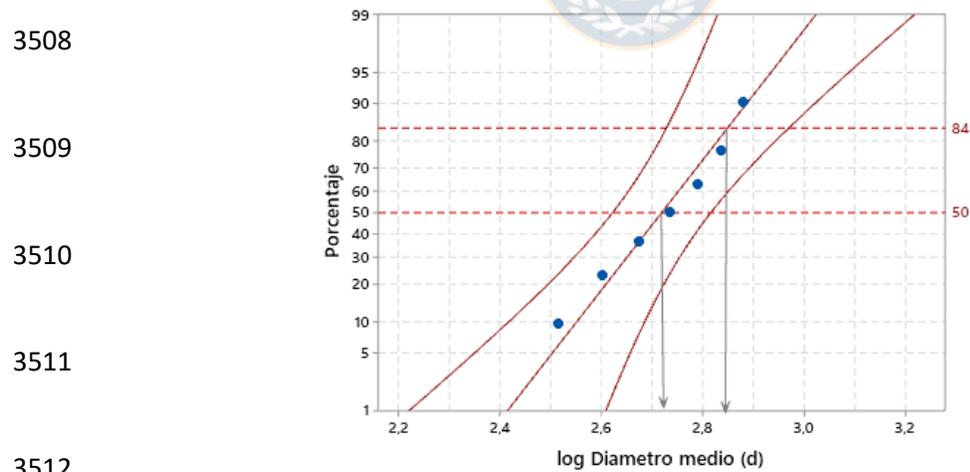
3497 En el histograma obtenido para PM5c se observa una distribución de tamaño
 3498 como se detalla en la Ilustración 94.

3499



3504 **Ilustración 94** Histograma de Frecuencias de tamaños de micropartículas de
 3505 *P. murcianum* (lote PM5c).

3506 Como la distribución de tamaños sigue siendo asimétrica, se normaliza a
 3507 través de un gráfico de probabilidad como se detalla en la Ilustración 95.



3513 **Ilustración 95** Gráfico de probabilidad para log de diámetro medio versus
 frecuencia porcentual acumulada en las micropartículas de *P. murcianum*
 3514 (lote PM5c).

3515 A partir de esta gráfica, se obtienen los valores $d_{50\%}$ y $d_{84\%}$, de esta forma se
3516 puede obtener el valor de la desviación estándar geométrica y con ello
3517 realizar los cálculos de los diámetros aritméticos. En la Tabla 41 se reúnen
3518 los valores de diámetro medio (DAV), superficie media (DS), volumen
3519 medio (DV) y razón volumen/superficie (DVS).

3520

3521 *Tabla 41. Diámetros geométricos y estadísticos para las micropartículas de*
3522 *P. murcianum (lote PM5c).*



Diámetros	Geométricos (μm)	Estadísticos (μm)
DAV	524,71	545,48
DVS	557,08	647,43
DS	532,88	569,37
DV	540,83	594,28

3523

3524 La última muestra seleccionada para un análisis granulométrico, fue el lote
3525 TA5b, cuyos valores obtenidos por microscopía óptica se detallan en la Tabla
3526 42.

3527

3528 *Tabla 42 Distribución de frecuencias de los tamaños de las micropartículas*
 3529 *de T. australis (lote TA5b).*

Intervalo	Diámetro medio (d)	Frecuencia (n)	n*d	n*d ²	n*d ³	Frec porcentual	Frec. porc. acumulada
[153,82-204,03]	178,93	11	1968	352155	63009460	3,40	3,40
[204,04-254,25]	229,14	33	7561	1732745	397049904	10,19	13,59
[254,26-304,47]	279,37	90	25142	7024032	1962268780	27,78	41,37
[304,48-354,69]	329,59	99	32628	10754000	3544357403	30,56	71,93
[354,70-404,91]	379,81	66	25067	9520621	3615979576	20,37	92,30
[404,92-455,13]	430,03	19	8170	3513508	1510896497	5,86	98,16
[455,14-505,35]	480,25	6	2881	1383811	664568582	1,85	100,01
SUMATORIAS		324	103420	34280875	11758130206	100,01	-

3530

3531 La Ilustración 96 muestra el histograma obtenido para TA5b, donde se
 3532 observa una distribución de tamaño que se tiende a normalizar, en
 3533 comparación al caso del lote TA4e.

3534

3535

3536

3537

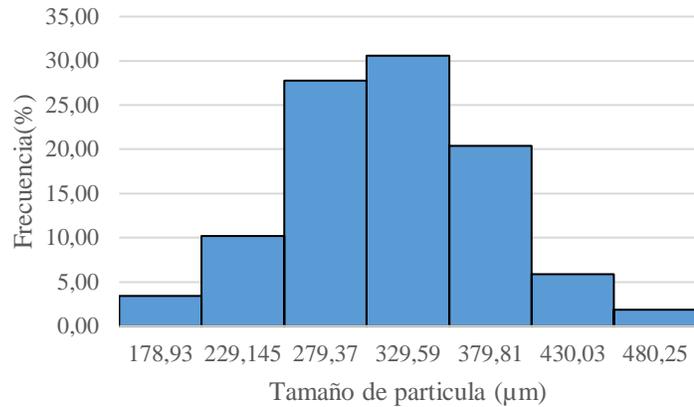
3538

3539

3540

3541

3542



3543

Ilustración 96 Histograma de frecuencias de tamaños de las micropartículas de *T. australis* (TA5b).

3544

3545

Como la distribución de tamaños es asimétrica, se normaliza a través de un

3546

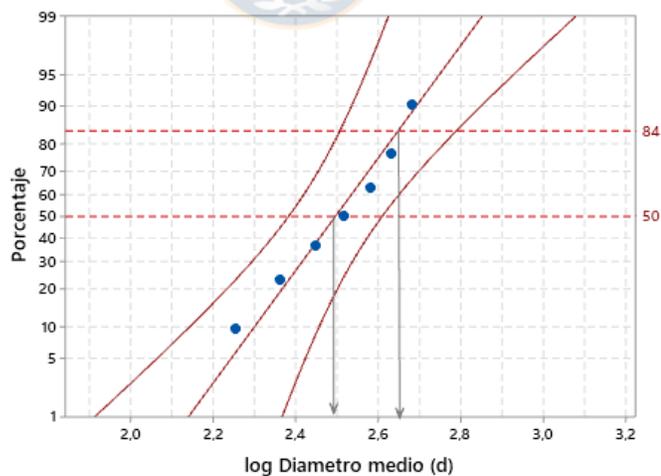
gráfico de probabilidad como se detalla en la Ilustración 97.

3547

3548

3549

3550



3551

3552

Ilustración 97 Gráfico de probabilidad para log de diámetro medio y frecuencia porcentual acumulada en las micropartículas de *T. australis* (lote

3553

TA5b).

3554 A partir de esta grafica se obtienen los valores $d_{50\%}$ y $d_{84\%}$, lo que permite
 3555 conocer la desviación estándar geométrica y con ello realizar los cálculos de
 3556 los diámetros aritméticos. En la Tabla 43 se reúnen los diámetros medio
 3557 (DAV), superficie media (DS), volumen medio (DV) y razón
 3558 volumen/superficie (DVS)

3559

3560 **Tabla 43** *Diámetros geométricos y estadísticos para las micropartículas de*
 3561 *T. australis (lote TA5b).*



Diámetros	Geométricos (μm)	Estadísticos (μm)
DAV	319,20	338,06
DVS	342,99	427,27
DS	325,28	358,45
DV	331,08	380,06

3562

3563 Al analizar los histogramas de las ultimas muestras, se observa una
 3564 distribución de tamaño que se tiende a normalizar, lo que indica valores más
 3565 homogéneos en los diámetros de las micropartículas obtenidas. Esto
 3566 posiblemente se logró al disminuir la frecuencia fijada en el
 3567 microencapsulador, lo que permitió la obtención de un chorro más estable.

3568 Con respecto al tamaño, en el caso de PM5c se utilizó una boquilla de mayor
3569 tamaño, sin embargo, los diámetros medios se mantuvieron similares a los
3570 valores observados en PM4e. Para el caso de *T. australis*, este disminuyó en
3571 TA5b con respecto a TA4e. Esto indica que la presencia de un chorro más
3572 estable, permite la obtención de micropartículas de tamaños más
3573 homogéneos. De esta forma, se reducirían las diferencias de tamaño por
3574 presencia de micropartículas en los rangos más extremos, lo que es
3575 favorecido con un chorro inestable.

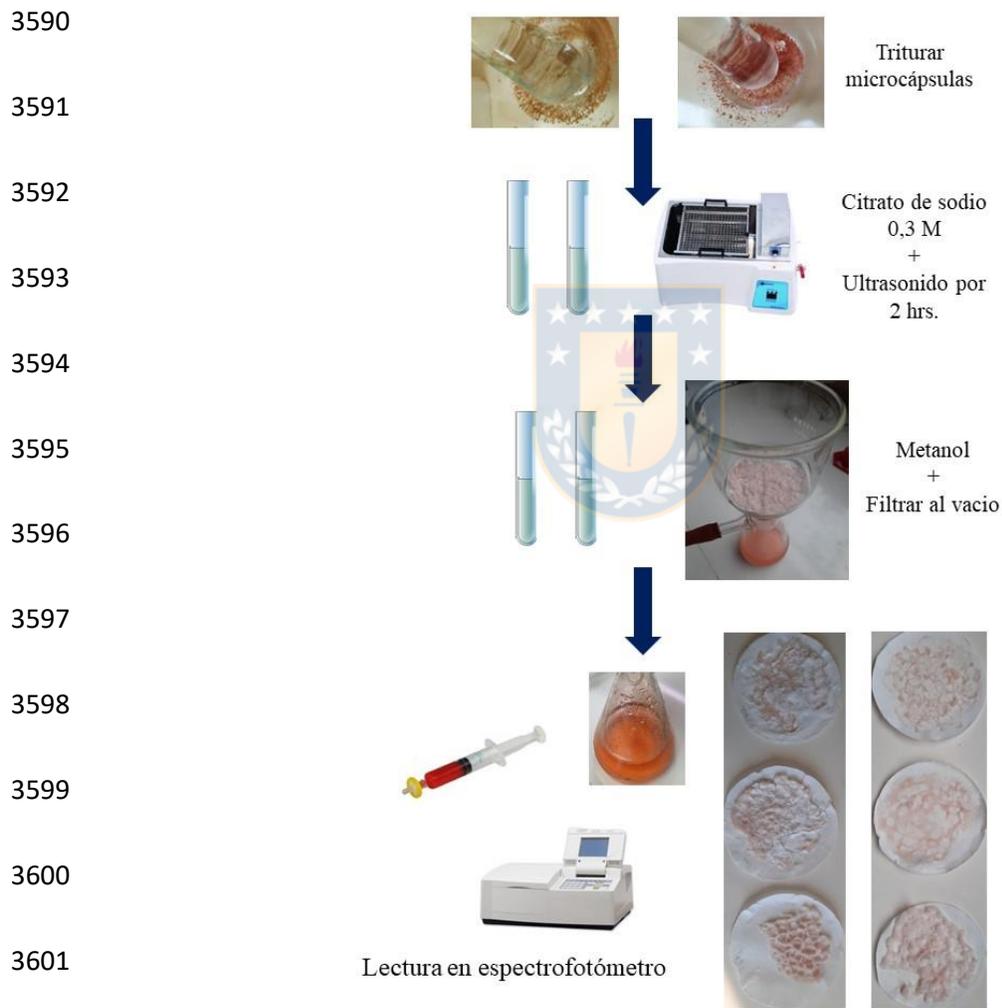


3576

3577 **12. Medición de la eficiencia de encapsulación por método**
3578 **espectrofotométrico.**

3579 La microencapsulación tiene cada vez más aplicaciones en los mercados de
3580 la cosmética y el cuidado personal. La búsqueda de ingredientes de origen
3581 natural como pigmentos, que reemplacen a los colorantes sintéticos, se hace
3582 urgente. Es por esta razón, que los microencapsulados obtenidos en este
3583 trabajo requieren ser caracterizados, y un parámetro importante para evaluar
3584 es la eficiencia de encapsulación. La determinación de la eficiencia de
3585 encapsulación fue compleja porque los pigmentos tuvieron una gran adhesión

3586 al material polimérico, dificultando la extracción requerida para el análisis.
3587 A continuación, en la Ilustración 98, se describe de manera resumida el
3588 proceso y se muestra como queda el material polimérico después de la
3589 primera extracción.



3602 *Ilustración 98* Proceso de extracción de pigmentos y determinación de
3603 *eficiencia de encapsulación.*

3605 Las dificultades en el proceso de extracción pueden deberse a una alta
 3606 adsorción que presentarían los pigmentos, ya que se observa una alta
 3607 persistencia de la coloración en el material polimérico. Al repetir el proceso,
 3608 se logró extraer más pigmento y se observa una menor coloración de la
 3609 matriz. En la Tabla 44 se detallan los porcentajes de eficiencia de
 3610 encapsulación en los distintos lotes.

3611

3612 **Tabla 44** Porcentaje de eficiencia de encapsulación para los distintos lotes
 3613 de pigmentos de *P. murcianum*.



Lote	Eficiencia de Encapsulación (%)
PM4a	12,1
PM4b	10,4
PM4c	15,8
PM4d	6,3
PM4e	32,9
PM5a	24,4
PM5b	25,1
PM5c	22,0
PM5d	28,4
TA4a	13,3
TA4b	13,2
TA4c	19,1
TA4d	7,3
TA4e	40,4
TA5a	41,5
TA5b	39,1

3614

3615 En los resultados destaca el lote PM4e con 32,9% y el lote TA5a con un
3616 41,5%, que corresponden a los valores más altos de eficiencia de
3617 encapsulación obtenidos. Sin embargo, es necesario optimizar el método para
3618 mejorar la encapsulación del pigmento. Otro factor que puede haber influido
3619 de manera negativa en el valor fue la pérdida de muestra durante el proceso
3620 de extracción. Esto pudo haber ocurrido cuando se traspasaba muestra del
3621 mortero al tubo de ensayo y en la etapa de filtración con embudo Büchner.
3622 A pesar de los inconvenientes este análisis aportó con antecedentes para
3623 contribuir a la elaboración de un método necesario para la medición de la
3624 eficiencia de encapsulación. Esto último es fundamental para una correcta
3625 caracterización de los microencapsulados elaborados en esta investigación.

3626

3627

3628

3629

3630

3631

3632

3633

CONCLUSIONES

3634
3635

3636 A través de los diversos ensayos realizados a los pigmentos de las especies
3637 fúngicas *P. murcianum* y *T. australis*, se evidenció la gran complejidad
3638 química de las muestras. Donde se observaron, una gran cantidad de
3639 pigmentos con características físico-químicas similares, dificultando la
3640 separación cromatográfica. Según los resultados obtenidos se puede afirmar
3641 que posiblemente estén presentes, pigmentos policétidos, como azafilonas e
3642 hidroxiantraquinoides los que tienen antecedentes de ser biológicamente
3643 activos. Para respaldar esto, se evaluó la propiedad antioxidante, siendo
3644 positiva en los ensayos realizados, otorgando una propiedad adicional como
3645 ingrediente cosmético. Además, se elaboró una formulación a través de
3646 gelación iónica con vibración asistida, que logró incorporar a los pigmentos
3647 fúngicos, como microencapsulados, para proteger las características físico-
3648 químicas y entregar una mayor estabilidad a la formulación cosmética. Los
3649 polvos de microencapsulados rojos y amarillos fueron caracterizados para
3650 avanzar en el cumplimiento de los requisitos básicos, para ser propuesto
3651 como colorante natural con propiedades antioxidantes y como materia prima
3652 en la industria cosmética.

BIBLIOGRAFÍA

3653

3654

- 3655 1. U.S. Food and Drug Administration. Generally Recognized as Safe
3656 (GRAS).
- 3657 2. Chemat F, Vian M, Cravotto G. Green extraction of natural products:
3658 Concept and principles. *Int J Mol Sci.* 2012;13(7):8615-8627.
- 3659 3. Virot M, Ginies C, Visinoni F, Chemat F. Green procedure with a
3660 green solvent for fats and oils ' determination Microwave-integrated
3661 Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger
3662 distillation. *J Chromatogr A.* 2008;1197:147-152.
3663 doi:10.1016/j.chroma.2008.04.035
- 3664 4. Pérez M, Ruiz D, Schneider M, Autino J, Romanelli G. La química
3665 verde como fuente de nuevos compuestos para el control de plagas
3666 agrícolas. *Cienc en Desarro.* 2013;4(2):83-91.
3667 [http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/ciencia_en_desarrollo/ar](http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/ciencia_en_desarrollo/article/viewFile/2642/2453)
3668 [ticle/viewFile/2642/2453](http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/ciencia_en_desarrollo/article/viewFile/2642/2453)
- 3669 5. Tuli HS, Chaudhary P, Beniwal V, Sharma AK. Microbial pigments
3670 as natural color sources: current trends and future perspectives. *J*
3671 *Food Sci Technol.* 2015;52(8):4669-4678. doi:10.1007/s13197-014-
3672 1601-6
- 3673 6. Galindo E, Peña C, Serrano-Carreón L. Domesticar microorganismos
3674 en un biorreactor: los retos del bioingeniero. In: *Una Ventana Al*
3675 *Quehacer Científico.* ; 2007:131-143. doi:10.1007/s00347-003-0847-6
- 3676 7. Mapari SAS, Thrane U, Meyer AS. Fungal polyketide azaphilone
3677 pigments as future natural food colorants ? *Trends Biotechnol.*
3678 2010;28(6):300-307. doi:10.1016/j.tibtech.2010.03.004
- 3679 8. Motoyama T, Osada H. Biosynthetic approaches to creating bioactive
3680 fungal metabolites: Pathway engineering and activation of secondary
3681 metabolism. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2016;26(24):5843-5850.
3682 doi:10.1016/j.bmcl.2016.11.013
- 3683 9. Lagashetti AC, Dufossé L, Singh SK, Singh PN. Fungal Pigments and
3684 Their Prospects in Different Industries. *Microorganisms.*
3685 2019;7(604):1-36. doi:10.3390/microorganisms7120604

- 3686 10. Mireille Fouillaud, Mekala Venkatachalam, Melissa Llorente, Helene
3687 Magalon PC& LD. Biodiversity of Pigmented Fungi Isolated from
3688 Marine Environment in La Reunion Island, Indian Ocean: New
3689 Resources for Colored Metabolites. *J Fungi*. 2017;3:24-45.
- 3690 11. Visagie CM, Yilmaz N, Frisvad JC, et al. Five new *Talaromyces*
3691 species with ampulliform-like phialides and globose rough walled
3692 conidia resembling *T. verruculosus*. *Mycoscience*. 2015;56(5):486-
3693 502. doi:10.1016/j.myc.2015.02.005
- 3694 12. Li C, Lin F, Sun W, et al. Constitutive hyperproduction of
3695 sorbicillinoids in *Trichoderma reesei* ZC121. *Biotechnol Biofuels*.
3696 2018;11:1-16.
- 3697 13. Guo J, Zhu C, Zhang C, et al. Thermolides, Potent Nematocidal PKS-
3698 NRPS Hybrid Metabolites from Thermophilic Fungus *Talaromyces*
3699 *thermophilus*. *J Am Chem Soc*. 2012;134:20306-20309.
3700 doi:10.1021/ja3104044
- 3701 14. Bohumil Proksa. REVIEW: *Talaromyces flavus* and its metabolites.
3702 *Chem Pap*. 2010;64(6):696-714. doi:10.2478/s11696-010-0073-z
- 3703 15. Laurent Dufossé. Microbial Pigments From Bacteria, Yeasts, Fungi,
3704 and Microalgae for the Food and Feed Industries. In: *Handbook of*
3705 *Food Bioengineering: Natural and Artificial Flavoring Agents and*
3706 *Food Dyes*. Woodhead Publishing; 2018:113-132.
- 3707 16. Pigments RR, Frisvad JC, Yilmaz N, et al. *Talaromyces atrovirens*, a
3708 New Species Efficiently Producing Industrially *Talaromyces*
3709 *atrovirens*, a New Species Efficiently Producing Industrially
3710 Relevant Red Pigments. 2013;154(December).
3711 doi:10.1371/journal.pone.0084102
- 3712 17. G. Reyes-González & M. Franco-Correa. Producción biotecnológica
3713 de sabores, pigmentos y aromas a partir de hongos miceliales y
3714 levaduras. *Univ Sci*. 2006;11(2):23-30.
- 3715 18. Hernandez V, Galleguillos F, Sagredo N, Machuca Á. A Note on the
3716 Dyeing of Wool Fabrics Using Natural Dyes Extracted from Rotten
3717 Wood-Inhabiting Fungi. *Coatings*. 2018;8(77):1-6.
- 3718 19. Hernández V, Galleguillos F, Thibaut R, Müller A. Fungal dyes for

- 3719 textile applications : testing of industrial conditions for wool fabrics
3720 dyeing. *J Text Inst.* Published online 2018:1-6.
3721 doi:10.1080/00405000.2018.1460037
- 3722 20. Frisvad JC, & RAS, Amelia C. Stolk. Disposition of recently
3723 described species of *Penicillium*. *Rijksherb.* 1990;14(2):209-232.
- 3724 21. Data Base PubChem. Compound Summary for CID 441140:
3725 Griseofulvin. Published 2019. Accessed February 2, 2019.
3726 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/griseofulvin#section=Top>
3727 p
- 3728 22. Data Base PubChem. Compound Summary for CID 1268111:
3729 Penicillic Acid. Published 2019. Accessed February 2, 2019.
3730 [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/penicillic_acid#section=](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/penicillic_acid#section=Top)
3731 [Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/penicillic_acid#section=Top)
- 3732 23. Data Base PubChem. Compound summary for CID 12118084
3733 Monascorubrin. National Library of Medicine. Published 2007.
3734 Accessed October 5, 2021.
3735 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Monascorubrin>
- 3736 24. Data Base PubChem. Compound Summary for CID 6451554:
3737 Mitorubrin. Published 2019. Accessed February 2, 2019.
3738 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6451554#section=Top>
- 3739 25. Li D, Chen Y, Tao M, Li H, Zhang W. Two New
3740 Octahydronaphthalene Derivatives from *Trichoderma spirale* , an
3741 Endophytic Fungus Derived from *Aquilaria sinensis*. 2012;95:805-
3742 809.
- 3743 26. Fundacion para la Innovación Agraria (FIA) M de A. Ingredientes
3744 funcionales: Una Nueva Industria para Chile. *Innova+agro.*:1-96.
- 3745 27. de Carvalho JC, Oliva Oishi B, Pandey A, Soccol CR. Biopigments
3746 from *Monascus*: strains selection, citrinin, production and color
3747 stability. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2005;48(6):885-894.
3748 doi:10.1590/S1516-89132005000800004
- 3749 28. Hernández V, Galleguillos F, Sagredo N, Machuca Á. Color fastness
3750 of fabrics after dyeing with fungal dyes. *Int J Cloth Sci Tech.*
3751 Published online 2020.

- 3752 29. Cheng-Lun Wu, Yao-Haur Kuo, Chun-Lin Lee Y-WH& T-MP.
3753 Synchronous High-Performance Liquid Chromatography with a
3754 Photodiode Array Detector and Mass Spectrometry for the
3755 Determination of Citrinin, Monascin, Ankaflavin, and the Lactone and
3756 Acid Forms of Monacolin K in Red Mold Rice. *J AOAC Int.*
3757 2011;94(1):179-190.
- 3758 30. Yuliana A, Singgih Wibowo M, Julianti E. Solubility and Toxicity
3759 Level of Monascus Pigments. *Trends Tech Sci Res.* 2018;2(4):65-67.
- 3760 31. Yang T, Liu J, Luo F, Lin Q, Rosol TJ, Deng X. Anticancer properties
3761 of Monascus metabolites. *Anticancer Drugs.* 2014;25:735-744.
3762 doi:10.1097/CAD.000000000000102
- 3763 32. Feng-Lang L, Jue-Liang H, Chang-Hung C, Wen-Jun W, Chi-I C,
3764 Hung-Jen L. Activation of p38 MAPK by damnacanthol mediates
3765 apoptosis in SKHep 1 cells through the DR5/TRAIL and
3766 TNFR1/TNF- α and p53 pathways. *Eur J Pharmacol.* 2011;650:120-
3767 129.
- 3768 33. Hernández V, Machuca Á, Saavedra I, Chavez D, Astuya A, Barriga
3769 C. Talaromyces australis and Penicillium murcianum pigment
3770 production in optimized liquid cultures and evaluation of their
3771 cytotoxicity in textile applications. *World J Microb Biot.*
3772 2019;35(10):1-9.
- 3773 34. Pastene ER. Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad
3774 antioxidante. *Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y*
3775 *Aromáticas.* 2009;8(6):449-455.
- 3776 35. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-ramma A, Aruoma OI,
3777 Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents :
3778 Mechanism and actions. *Mutat Res.* 2005;579(1-2):200-213.
3779 doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023
- 3780 36. Gao J, Yang S, Qin J. Azaphilones : Chemistry and Biology. *Chem*
3781 *Rev.* 2013;113(7):4755-4811. doi:10.1021/cr300402y
- 3782 37. Chen C, Tao H, Chen W, et al. Recent advances in the chemistry and
3783 biology of azaphilones. *RSC Adv.* 2020;10(17):10197-10220.
3784 doi:10.1039/d0ra00894j

- 3785 38. Gao J, Yang S, Qin J. Azaphiloneoids: Chemistry and Biology. *Chem*
3786 *Rev.* 2013;113(7):4755-4811.
- 3787 39. Ezquerro-Brauer JM, Chan-Higuera JE. Antioxidant capacity and
3788 mechanism of action of pigments in marine organisms. *Biotecnol y*
3789 *Ciencias Agropecu.* 2021;15(2):186-197.
3790 doi:<https://doi.org/10.29059/cienciauat.v15i2.1501>
- 3791 40. Heo YM, Kim K, Kwon SL, et al. Investigation of Filamentous Fungi
3792 Producing Safe , Functional Water-Soluble Pigments. *Mycobiology.*
3793 2018;46(3):269-277. doi:10.1080/12298093.2018.1513114
- 3794 41. Combes R, Haveland-Smith R. A review of the genotoxicity of food ,
3795 drug and cosmetic colours and other azo , triphenylmethane and
3796 xanthene dyes. *Mutat Res-Rev Genet.* 1982;98:101-243.
- 3797 42. Nohynek GJ, Fautz R, Benech-Kieffer F, Toutain H. Toxicity and
3798 human health risk of hair dyes. *Food Chem Toxicol.* 2004;42(4):517-
3799 543. doi:10.1016/j.fct.2003.11.003
- 3800 43. Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical
3801 properties of antioxidants using DPPH- assay: A critical review and
3802 results. *Food Chem.* 2012;130(4):1036-1043.
3803 doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.127
- 3804 44. Ou B, Chang T, Huang D, Prior R. Determination of Total
3805 Antioxidant Capacity by Oxygen Radical Absorbance Capacity
3806 (ORAC) Using Fluorescein as the Fluorescence Probe: First Action
3807 2012.23. *J Aoac Int.* 2013;96(6):1372-1377.
- 3808 45. Hernández A, Hernández A, Luis M, et al. Nuevo método para la
3809 síntesis de 1 , 2-difenil-2 N - arilamino-etanonas por irradiación con
3810 microondas en ausencia de disolventes. Published online 2002.
- 3811 46. Guerra-Tapia A, Gonzalez-Guerra E. Hair cosmetics: Dyes. *Actas*
3812 *Dermosifiliogr.* 2014;105(9):833-839.
3813 doi:10.1016/j.adengl.2014.02.003
- 3814 47. González-Muñoz P, Conde-Salazar L, Vañó-Galván S. Allergic
3815 contact dermatitis caused by cosmetic products. *Actas Dermosifiliogr.*
3816 2014;105(9):822-832. doi:10.1016/j.adengl.2014.09.007

- 3817 48. Conde L. Dermatitis producida por una tintura para el pelo . (Quinona
3818 resultante de la acción del agua oxigenada sobre el clorhidrato de
3819 parafenileno-diamina), por Juan de Azúa. *Actas Dermosifiliogr.*
3820 2009;100(2):100-102. doi:10.1016/S0001-7310(09)70226-1
- 3821 49. Crebelli R, Conti L, Carere A, Zito R. Mutagenicity of commercial p-
3822 phenylenediamine and of an oxidation mixture of p-phenylenediamine
3823 and resorcinol in salmonella typhimurium TA98. *Food Cosmet*
3824 *Toxicol.* 1981;19(C):79-84.
- 3825 50. Marcela Castillo Cortés JMCC& JHN. Desechos Líquidos: El Caso de
3826 las Salas de Belleza. *Uniciencia.* 2012;26(1-2):23-27.
3827 <https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/uniciencia/article/view/3859>
- 3828 51. Aurora Benaiges. Tintes Capilares: Evolución Histórica y Situación
3829 Actual. *Offarm.* 2007;26(10):68-72.
- 3830 52. James Swarbrick. Microencapsulation: Methods and Industrial
3831 Applications. In: Simon Benita, ed. Second Edi. ; 2006:757.
- 3832 53. Islam S. Development of Automotive Textiles with Antiodour /
3833 Antimicrobial Properties. 2008;(January 2008).
- 3834 54. Ozkan G, Franco P, De Marco I, Xiao J, Capanoglu E. A review of
3835 microencapsulation methods for food antioxidants: Principles,
3836 advantages, drawbacks and applications. *Food Chem.* 2019;272:494-
3837 506. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.205
- 3838 55. Suganya V, Anuradha V. Microencapsulation and Nanoencapsulation:
3839 A Review. *Int J Pharm Clin Res.* 2017;9(3):233-239.
3840 doi:10.25258/ijpcr.v9i3.8324
- 3841 56. Leong JY, Lam WH, Ho KW, et al. Advances in fabricating spherical
3842 alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic
3843 gelation as encapsulation systems. *Particuology.* 2016;24:44-60.
3844 doi:10.1016/j.partic.2015.09.004
- 3845 57. Solís A, Fleury C, Muñoz V, Teórico M. Gelificación de Alginatos.
- 3846 58. Merck Chile. Alginic acid from brown algae. Published 2018.
3847 Accessed October 8, 2018.
3848 <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a7003?lang=es>

- 3849 ®ion=CL
- 3850 59. Romero GCA, Malo a L, Palou E. *Propiedades Del Alginato y*
3851 *Aplicaciones En Alimentos*. Vol 1.; 2013. doi:10.1016/S0141-
3852 0229(03)00203-5
- 3853 60. Lupo B, González C, Maestro A. Microencapsulación con alginato en
3854 alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Rev Venez Cienc y Tecnol*
3855 *Aliment*. 2012;3(1):130-151.
- 3856 61. Ravindra Reddy K, Sabitha Reddy P. Effect of different co-polymers
3857 on sodium alginate microcapsules containing isoniazid. *Int J*
3858 *PharmTech Res*. 2010;2(4):2198-2203.
- 3859 62. Cash MJ, Caputo SJ. *Food Stabilizers, Thickeners and Gelling*
3860 *Agents*.; 2010. [http://blog.ub.ac.id/fawzy/files/2013/07/Food-](http://blog.ub.ac.id/fawzy/files/2013/07/Food-Stabilizer.pdf#page=66)
3861 [Stabilizer.pdf#page=66](http://blog.ub.ac.id/fawzy/files/2013/07/Food-Stabilizer.pdf#page=66)
- 3862 63. Liu XD, Yu WY, Zhang Y, et al. Characterization of structure and
3863 diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or
3864 internal calcium sources. *J Microencapsul*. 2002;19(6):775-782.
3865 doi:10.1080/0265204021000022743
- 3866 64. Champagne CP, Fustier P. Microencapsulation for the improved
3867 delivery of bioactive compounds into foods. *Curr Opin Biotechnol*.
3868 2007;18(2):184-190. doi:10.1016/j.copbio.2007.03.001
- 3869 65. González RE, Tarón A, Morón LB. Formación de microcápsulas de
3870 tamaño controlado por gelación iónica utilizando mezclas
3871 biopoliméricas binarias. *Inf Tecnol*. 2015;26(6):31-38.
3872 doi:10.4067/S0718-07642015000600005
- 3873 66. Shariatnia Z. Pharmaceutical applications of chitosan. *Adv Colloid*
3874 *Interface Sci*. 2019;263:131-194.
3875 doi:<https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.11.008>
- 3876 67. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid
3877 (hyaluronan): A review. *Vet Med (Praha)*. 2008;53(8):397-411.
3878 doi:10.17221/1930-VETMED
- 3879 68. Athamneh T, Amin A, Benke E, et al. Alginate and hybrid alginate-
3880 hyaluronic acid aerogel microspheres as potential carrier for

- 3881 pulmonary drug delivery. *J Supercrit Fluids*. 2019;150:49-55.
3882 doi:10.1016/j.supflu.2019.04.013
- 3883 69. BÜCHI Latinoamérica S. de R.L. de C.V. Encapsulator B-390.
3884 Accessed October 4, 2018. [https://www.buchi.com/es-](https://www.buchi.com/es-es/products/spray-drying-and-encapsulation/encapsulator-b-390)
3885 [es/products/spray-drying-and-encapsulation/encapsulator-b-390](https://www.buchi.com/es-es/products/spray-drying-and-encapsulation/encapsulator-b-390)
- 3886 70. Banerjee H, Shen S, Ren H. Magnetically Actuated Minimally
3887 Invasive Microbots for Biomedical Applications Double Network
3888 (DN) Hydrogel for Biomedical Soft Robots View project Soft robots
3889 with flexibility, compliance & intelligence for Bio Robotics View
3890 project Magnetically Actuated Minimally Invasive Microbots for
3891 Biomedical Applications. Published online 2018. doi:10.1007/978-
3892 981-10-6035-9_2
- 3893 71. BÜCHI Labortechnik AG. Manual operativo del Encapsulator B-390.
3894 Published 2016. Accessed October 22, 2018.
3895 [https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/11593481_B-](https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/11593481_B-390_OM_es_C_LR_0.pdf?93abfae7b3d811629f5a166c0e4206feafbab924)
3896 [390_OM_es_C_LR_0.pdf?93abfae7b3d811629f5a166c0e4206feafbab](https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/11593481_B-390_OM_es_C_LR_0.pdf?93abfae7b3d811629f5a166c0e4206feafbab924)
3897 [924](https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/11593481_B-390_OM_es_C_LR_0.pdf?93abfae7b3d811629f5a166c0e4206feafbab924)
- 3898 72. Attimarad M, Mueen Ahmed KK, Aldhubaib BE, Harsha S. High-
3899 performance thin layer chromatography: A powerful analytical
3900 technique in pharmaceutical drug discovery. *Pharm Methods*.
3901 2011;2(2):71-75. doi:10.4103/2229-4708.84436
- 3902 73. Inoue K, Ito Y, Hattori Y, et al. Efficient purification of
3903 xanthomonasin A and B high-speed countercurrent from *Monascus*
3904 yellow colorant by chromatography. *JJFCS*. 2010;17(3):185-191.
- 3905 74. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical
3906 method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*.
3907 1995;28(1):25-30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- 3908 75. Yan H, Mengzhu Z, Xiaoying D, Dan Z, Han C, Xincai X.
3909 Preparation and characterization of alginate-hyaluronic acid-chitosan
3910 composite gel beads. *J Wuhan*. 2015;30(6):1297-1303.
- 3911 76. Lindenhayn K, Perka C, Spitzer RS, et al. Retention of hyaluronic
3912 acid in alginate beads: Aspects for in vitro cartilage engineering. *J*
3913 *Biomed Mater Res*. 1999;44(2):149-155. doi:10.1002/(SICI)1097-

- 3914 4636(199902)44:2<149::AID-JBM4>3.0.CO;2-C
- 3915 77. Ohta N, Robertson A. *Colorimetry: Fundamentals and Applications*.
3916 John Wiley & Sons, Ltd; 2005.
- 3917 78. Mapari SA, Meyer AS, Thrane U. Colorimetric characterization for
3918 comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants.
3919 Published online 2006:7027-7035.
3920 doi:<https://doi.org/10.1021/jf062094n>
- 3921 79. Convention TUSP. Pruebas Físicas (776) Microscopía óptica. In: *USP*
3922 *30 Farmacopea de Los Estados Unidos de América: Formulario*
3923 *Nacional*. ; 2007:342.
- 3924 80. M. E. Aulton. *Pharmaceutics, The Science of Dosage Form Design*.
3925 Second Ed. Churchill Livingstone; 2002. doi:10.1360/zd-2013-43-6-
3926 1064
- 3927 81. Montenegro A, Nahmad Molinari Y, Sarocchi D, Bartali R, Rodríguez
3928 LÁ. Optical granulometry by digital image processing. *22nd Congr*
3929 *Int Comm Opt Light Dev World*. 2011;8011:1-8.
3930 doi:10.1117/12.902633
- 3931 82. Aizpurua-Olaizola O, Navarro P, Vallejo A, Olivares M, Etxebarria
3932 N, Usobiaga A. Microencapsulation and storage stability of
3933 polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Food Chem*.
3934 2016;190:614-621. doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.117
- 3935 83. Sajid S, Akbar N. Applications of fungal pigments in biotechnology.
3936 *PAB*. 2018;7(3):922-930.
- 3937 84. Wolfender JL, Marti G, Thomas A, Bertrand S. Current approaches
3938 and challenges for the metabolite profiling of complex natural
3939 extracts. *J Chromatogr A*. Published online 2014:136-164.
3940 doi:10.1016/j.chroma.2014.10.091
- 3941 85. Bojczuk M, Żyżelewicz D, Hodurek P. Centrifugal partition
3942 chromatography – A review of recent applications and some classic
3943 references. *J Sep Sci*. 2017;40(7):1597-1609.
3944 doi:10.1002/jssc.201601221
- 3945 86. Friesen J, McAlpine J, Chen S, Pauli G. Countercurrent Separation of

- 3946 Natural Products: An Update. *J Nat Prod.* 2015;78:1765-1796.
- 3947 87. Blaženović I, Kind T, Ji J, Fiehn O. Software tools and approaches for
3948 compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics.
3949 *Metabolites.* 2018;8:1-23. doi:10.3390/metabo8020031
- 3950 88. Aro YC, Namale LA, Ouillaud MF, Aurent PL, Etit TP, Ufosse LD.
3951 Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade
3952 colorants : an overview. *Nat Prod Bioprospect.* 2012;(2):174-193.
3953 doi:10.1007/s13659-012-0086-0
- 3954 89. Hajjaj H, Klaébé A, Loret MO, Tzedakis T, Goma G, Blanc PJ.
3955 Production and Identification of N -Glucosylrubropunctamine and N -
3956 Glucosylmonascorubramine from *Monascus ruber* and Occurrence of
3957 Electron Donor-Acceptor Complexes in These Red Pigments. *Appl*
3958 *Environ Micro.* 1997;63(7):2671-2678.
- 3959 90. Singgih M, Permana B, Anandia S, Maulidya I, Yuliana A. Studi In
3960 Silico Metabolit Sekunder *Kapang Monascus sp.* Sebagai Kandidat
3961 Obat Antikolesterol dan Antikanker. *ALCHEMY J Penelit Kim.*
3962 2019;15(1):104-123. doi:10.20961/alchemy.15.1.25294.104-123
- 3963 91. Woo PCY, Lam C, Tam EWT, et al. First Discovery of Two
3964 Polyketide Synthase Genes for Mitorubrinic Acid and Mitorubrinol
3965 Yellow Pigment Biosynthesis and Implications in Virulence of
3966 *Penicillium marneffeii*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(10):1-10.
3967 doi:10.1371/journal.pntd.0001871
- 3968 92. Mapari SA s., Hansen ME, Meyer AS, Thrane U. Computerized
3969 Screening for Novel Producers of *Monascus*- like Food Pigments in
3970 *Penicillium* Species. *J og Agric Food Chem.* 2008;56(1):9981-9989.
- 3971 93. Patakova P. *Monascus* secondary metabolites : production and
3972 biological activity. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2013;40:169-181.
3973 doi:10.1007/s10295-012-1216-8
- 3974 94. National Center for Biotechnology. COMPOUND SUMMARY
3975 Sterigmatocystin. PubChem Database.
- 3976 95. Yuliana A, Singgih M, Julianti E, Blanc PJ. Derivates of azaphilone
3977 *Monascus* pigments. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2017;9(December
3978 2016):183-194. doi:10.1016/j.bcab.2016.12.014

- 3979 96. Chen W, Chen R, Liu Q, He Y, He K, Ding X. Orange, Red, Yellow:
3980 Biosynthesis of Azaphilone Pigments in *Monascus* Fungi. *Chem Sci*.
3981 2017;8:4917-4925. doi:10.1039/C7SC00475C
- 3982 97. Wu G, Ma H, Zhu T, Li J, Gu Q, Li D. Penilactones A and B , two
3983 novel polyketides from Antarctic deep-sea derived fungus *Penicillium*
3984 *crustosum* PRB-2. *Tetrahedron*. 2012;68(47):9745-9749.
3985 doi:10.1016/j.tet.2012.09.038
- 3986 98. Yang H, Li J, Wang Y, Gan C. Identification of water-soluble
3987 *Monascus* yellow pigments using HPLC-PAD-ELSD, high-resolution
3988 ESI-MS, and MS-MS. *Food Chem*. 2018;245(1):536-541.
- 3989 99. Yang H, Li J, Wang Y, Gan C. Identification of water-soluble
3990 *Monascus* yellow pigments using HPLC-PAD-ELSD, high-resolution
3991 ESI-MS, and MS-MS. *Food Chem*. 2018;245(1):536-541.
3992 doi:10.1016/j.foodchem.2017.10.121
- 3993 100. Hsu Y, Hsu L, Liang Y, Kuo Y, Pan T. New Bioactive Orange
3994 Pigments with Yellow Fluorescence from *Monascus* -Fermented
3995 *Dioscorea*. Published online 2011:4512-4518. doi:10.1021/jf1045987
- 3996 101. Hsu Y-W, Hsu L-C, Liang Y-H, Kuo Y-H, Pan T-M. Monaphilones A
3997 - C , Three New Antiproliferative Azaphilone Derivatives from
3998 *Monascus purpureus* NTU 568. *J Agric Food Chem*. 2010;58:8211-
3999 8216. doi:10.1021/jf100930j
- 4000 102. Isbrandt T, Tolborg G, Ødum A, Workman M, Larsen TO.
4001 Atrorosins : a new subgroup of *Monascus* pigments from *Talaromyces*
4002 *atorroseus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;104(2):615–622.
4003 doi:https://doi.org/10.1007/s00253-019-10216-3
4004 BIOTECHNOLOGICAL
- 4005 103. National Center for Biotechnology Information. COMPOUND
4006 SUMMARY 1,5-Diaminochloro-4,8-dihydroxyanthraquinone.
4007 PubChem Database.
- 4008 104. National Center for Biotechnology. COMPOUND SUMMARY 1,4-
4009 Bis(methylamino)anthraquinone. PubChem Database.
- 4010 105. Caro Y, Venkatachalam M, Lebeau J, Fouillaud M, Dufoss L.
4011 *Pigments and Colorants from Filamentous Fungi*. Springer

- 4012 International Publishing; 2015. doi:10.1007/978-3-319-19456-1
- 4013 106. National Center for Biotechnology Information. COMPOUND
4014 SUMMARY 2-Acetyl-3,8-dihydroxy-6-methoxy-9,10-anthraquinone.
4015 PubChem Database.
- 4016 107. Loret M-O, Morel S. Isolation and Structural Characterization of Two
4017 New Metabolites from *Monascus*. *J Agric Food Chem*.
4018 2010;(58):1800-1803. doi:10.1021/jf903231p
- 4019 108. Schneider GM, Tuma D, Winter M, Wagner B. *Crystal Structure of 1,*
4020 *4-Bis (Ethylamino) Anthracene-9 , 10-Dione.*; 2001.
- 4021 109. Tolborg G, Ødum ASR, Isbrandt T, Larsen TO, Workman M. Unique
4022 processes yielding pure azaphilones in *Talaromyces atrovirens*. *Appl*
4023 *Microbiol Biotechnol*. 2020;104(2):603-613.
4024 doi:https://doi.org/10.1007/s00253-019-10112-w
4025 BIOTECHNOLOGICAL
- 4026 110. Feng Y, Shao Y, Chen F. *Monascus* pigments. *Appl Microbiol*
4027 *Biotechnol*. 2012;96:1421-1440. doi:10.1007/s00253-012-4504-3
- 4028 111. Shi Y, Liao V, Pan T. Monascin from red mold *Dioscorea* as a novel
4029 antidiabetic and antioxidative stress agent in rats and *Caenorhabditis*
4030 *elegans*. *Free Radic Bio Med*. 2012;52(1):109-117.
- 4031 112. Srianta I, Zubaidah E, Estiasih T, Iuchi Y, Harijono, Yamada M.
4032 Antioxidant activity of pigments derived from *Monascus purpureus*-
4033 fermented rice , corn , and sorghum. *Int Food Res J*. 2017;24(3):1186-
4034 1191.
- 4035 113. Li H, Li X, Li X, et al. Antioxidant Hydroanthraquinones from the
4036 Marine Algal-Derived Endophytic Fungus *Talaromyces islandicus*
4037 EN-501. *J Nat Prod*. 2017;80(1):162-168.
4038 doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00797
- 4039 114. Saha K, Lam K, Abas F, et al. Synthesis of damnacanthal , a naturally
4040 occurring 9, 10- anthraquinone and its analogues , and its biological
4041 evaluation against five cancer cell lines. *Med Chem Res*.
4042 2013;22(1):2093-2104.
- 4043 115. Convention TUSP. (1061) Color—Medición Instrumental. In: *USP 30*

4044 *Farmacopea de Los Estados Unidos de América: Formulario*
4045 *Nacional.* ; 2007:550.

4046 116. Convention TUSP. (811) Finura de polvos. In: *USP 30 Farmacopea*
4047 *de Los Estados Unidos de América: Formulario Nacional.* Vol 2. ;
4048 2007:389.

4049

4050

4051

4052

4053

4054

4055

4056

4057

4058

4059

4060

4061

4062

4063

4064

4065

4066

4067

4068

4069



AUTORIZACIÓN

4070

4071

4072

4073

4074

4075

4076

4077

4078

4079

4080

4081

4082

4083

Quien suscribe, Paulina Inés Contreras Machuca, alumna del Programa Magister en Ciencias Farmacéuticas, que imparte la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Concepción, declara ser autora de "Pigmentos de *Penicillium murcianum* y *Talaromyces australis* y su evaluación como ingredientes funcionales para la industria cosmética", y conceder derecho de publicación, comunicación al público y reproducción de esa obra, en forma total o parcial en cualquier medio y bajo cualquier forma del mismo, a la Universidad de Concepción, Chile, para formar parte de la colección material o digital de cualquiera de las Bibliotecas de la Universidad de Concepción y del Repositorio Institucional UdeC. Esta autorización es de forma libre y gratuita, y considera la reproducción de la obra con fines académicos y de difusión tanto nacional como internacionalmente.

4084

4085

Asimismo, quien suscribe declara que dicha obra no infringe derechos de autor de terceros.

4086

4087

4088

4089

4090

4091

4092

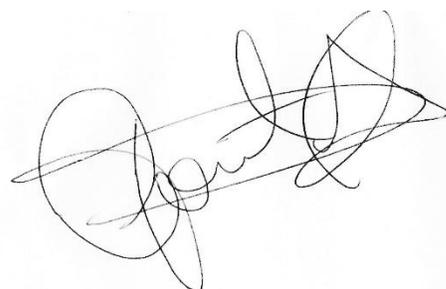
4093

4094

4095

4096

Concepción, 09-11-2021



.....