

Mejoramiento de la bioproducción de pigmentos y metabolitos antioxidantes generados por *actinobacterias* marinas del caribe Colombiano para su aplicación en la industria cosmética.

**Autor:
Paula Senobia Rhenals Montoya**

**Supervisado por:
Luisa Marcela Villamil Díaz, Dr.
Luis Eduardo Díaz Barrera, Dr.**

Mejoramiento de la bioproducción de pigmentos y metabolitos antioxidantes generados por *actinobacterias* marinas del caribe Colombiano para su aplicación en la industria cosmética.

Trabajo de grado presentado para optar por el título de:
“Magíster en diseño y gestión de procesos” por:

Paula Senobia Rhenals Montoya
Ingeniera Química

Supervisado por:

Luisa Marcela Villamil Díaz, Dr.
Tutor

Luis Eduardo Díaz Barrera, Dr.
Tutor

**Maestría en diseño y gestión de procesos
Énfasis en procesos químicos
Facultad de ingeniería
Universidad de la Sabana
2023**

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	10
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVOS	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos.....	14
CAPÍTULO 1: ESTADO DEL ARTE	15
CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA.....	18
2.1. Selección de cepas:.....	18
2.2. Selección del medio de cultivo.....	18
2.3. Preparación de las fermentaciones variando las fuentes de carbono y de nitrógeno..	18
2.4. Obtención del extracto crudo:.....	19
2.5. Determinación de la concentración del pigmento en extracto crudo:.....	19
2.6. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto crudo:.....	19
2.6.1. Capacidad de barrido de radicales ABTS	19
2.6.2. Capacidad de barrido de radicales DPPH:	20
2.7. Evaluación de los principales factores que influyen en la producción de los pigmentos y metabolitos antioxidantes	20
2.8. Análisis de superficie de respuesta.....	22
2.9. Análisis estadístico de los modelos	22
2.10. Evaluación de los compuestos presentes en los extractos crudos con capacidad antioxidante, responsables de las bioactividades:	22
2.11. Determinación de la capacidad inhibidora de la enzima colagenasa del extracto crudo.....	23
2.12. Determinación de la capacidad inhibidora de la enzima hialuronidasa del extracto crudo:	23
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
CAPÍTULO 3.1. CONDICIONES DE CULTIVO QUE PERMITAN INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS Y DE METABOLITOS ANTIOXIDANTES	24
3.1.1. Selección de las cepas.....	24
3.1.2. Selección del medio de cultivo	26
3.1.3.Efecto de la fuente de carbono.....	30
3.1.4.Efecto de la fuente de nitpigmentadrógeno	35

3.1.5. Evaluación de las variables que afectan a los pigmentos y metabolitos antioxidantes mediante el diseño Plackett-Burman:.....	35
3.1.6. Optimización mediante metodología de superficie de respuesta:	49
CAPÍTULO 3.2. COMPUESTOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS CRUDOS RESPONSABLES DE LAS BIOACTIVIDADES	66
CAPÍTULO 3.3. POTENCIAL DE INHIBICIÓN DE ENZIMAS CAUSANTES DE ENVEJECIMIENTO PREMATURO.....	70
3.3.1. Potencial de inhibición de la enzima hialuronidasa	70
3.3.2. Potencial de inhibición de la enzima colagenasa	73
CONCLUSIONES.....	75
REFERENCIAS	77

Figura 1. Crecimiento de cepas <i>G. hongkongensis</i> en su medio de aislamiento (a) <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivada en medio Zobell con agar b) <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivada en medio GYM con agar, durante 7 días a 30°C.....	25
Figura 2. Barrido de longitud de onda de extractos etanólicos crudo obtenidos de biomasa liofilizada de <i>G. hongkongensis</i> . La cepa <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 fue cultivada en medio Zobell y la cepa <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 en medio GYM.....	25
Figura 3. Efecto del medio de cultivo sobre (a) peso seco de la producción de biomasa (b) absorbancia del extracto etanólico crudo medida a 490 nm (c) Capacidad de captura de radicales DPPH medida a 515 nm (d) Capacidad de captura de radicales ABTS medida a 735 nm. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivada en medio GYM y Zobell.....	28
Figura 4. Efecto del medio de cultivo sobre (a) peso seco de la producción de biomasa (b) absorbancia del extracto etanólico crudo medida a 490 nm (c) Capacidad de captura de radicales DPPH medida a 515 nm (d) Capacidad de captura de radicales ABTS medida a 735nm. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivada en medio GYM y Zobell.....	29
Figura 5. Comparación múltiple del efecto del medio de la fuente de carbono sobre (a) absorbancia del extracto etanólico crudo medida a 490 nm (b) Capacidad de captura de radicales DPPH medida a 515 nm (c) Capacidad de captura de radicales ABTS medida a 735nm (d) rendimiento de extracción etanólica. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivadas en medio GYM.	32
Figura 6. Efecto del medio de la fuente de carbono sobre (a) absorbancia del extracto etanólico crudo medida a 490 nm (b) Capacidad de captura de radicales DPPH medida a 515 nm (d) Capacidad de captura de radicales ABTS medida a 735nm (d) rendimiento de la extracción etanólica. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivadas en medio GYM.....	33
Figura 7. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de los factores implicados en la absorbancia de los extractos etanólicos crudos medida a 490nm. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los factores se analizaron mediante un diseño de Plackett Burman.....	40
Figura 8. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de los factores implicados en la absorbancia de los extractos etanólicos crudos medida a 490nm. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los factores se analizaron mediante un diseño de Plackett Burman.....	41

Figura 9. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de los factores implicados en la capacidad de captura de radicales DPPH de los extractos etanólicos crudos medida a 515nm. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los factores se analizaron mediante un diseño de Plackett Burman.	42
Figura 10. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de los factores implicados en la capacidad de captura de radicales DPPH de los extractos etanólicos crudos medida a 515nm. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivada en medio GYM.	43
Figura 11. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de los factores implicados en la capacidad de captura de radicales ABTS de los extractos etanólicos crudos medida a 735nm. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivada en medio GYM.	44
Figura 12. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de los factores implicados en la capacidad de captura de radicales ABTS de los extractos etanólicos crudos medida a 735nm. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivada en medio GYM.....	45
Figura 13. Diagrama de los efectos estandarizados principales de los factores implicados en la absorbancia y la capacidad de captura de radicales DPPH y ABTS de extractos etanólicos. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 y <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivadas en medio GYM.....	46
Figura 14. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta muestran el efecto sobre la absorbancia del extracto crudo de la interacción entre (a) la temperatura y la concentración de inóculo con la velocidad de agitación en el nivel óptimo (b) y la velocidad de agitación y la concentración de inóculo con la temperatura en el nivel óptimo (c) la temperatura y la velocidad de agitación y su efecto mutuo sobre la absorbancia del extracto crudo con la concentración de inóculo en el nivel óptimo.	54
Figura 15. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta muestran el efecto sobre la absorbancia del extracto crudo de la interacción entre (a) la temperatura y la concentración de inóculo con la velocidad de agitación en el nivel óptimo (b) y la velocidad de agitación y la concentración de inóculo con la temperatura en el nivel óptimo (c) la temperatura y la velocidad de agitación y su efecto mutuo sobre la absorbancia del extracto crudo con la concentración de inóculo en el nivel óptimo.	56
Figura 16. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta muestran el efecto sobre la capacidad de captura de radicales DPPH del extracto crudo de la interacción entre (a) la temperatura y la concentración de inóculo con la velocidad de agitación en el nivel óptimo (b) la velocidad de agitación y la concentración de inóculo con la temperatura en el nivel óptimo (c) la temperatura y la velocidad de agitación con la concentración de inóculo en el nivel óptimo.	58
Figura 17. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta muestran el efecto sobre la capacidad de captura de radicales DPPH del extracto crudo de la interacción entre (a) la temperatura y la concentración de inóculo con la velocidad de agitación en el nivel óptimo (b) la velocidad de agitación y la concentración de inóculo con la temperatura en el nivel óptimo (c) la temperatura y la velocidad de agitación con la concentración de inóculo en el nivel óptimo..	60
Figura 18. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta muestran el efecto sobre el extracto crudo de la capacidad de secuestro de radicales ABTS de la interacción entre (a) la temperatura y la concentración de inóculo con la velocidad de agitación en el nivel óptimo (b) la velocidad de agitación y la concentración de inóculo con la temperatura	

en el nivel óptimo (c) la temperatura y la velocidad de agitación con la concentración de inóculo en el nivel óptimo.	62
Figura 19. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta muestran el efecto sobre el extracto crudo de la capacidad de secuestramiento de radicales ABTS de la interacción entre (a) la temperatura y la concentración de inóculo con la velocidad de agitación en el nivel óptimo (b) la velocidad de agitación y la concentración de inóculo con la temperatura en el nivel óptimo (c) la temperatura y la velocidad de agitación con la concentración de inóculo en el nivel óptimo.	64
Figura 20. Cromatograma del extracto crudo con capacidad antioxidante (<i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8).	67
Figura 21. Estructura de (a) 3-Hidroxi-b,e-caroten-3'-ona (C ₄₀ H ₅₄ O ₂) (b) 1,2-Dihidroliscopeno (C ₄₀ H ₅₈).	67
Figura 22. Cromatograma del extracto crudo con actividad antioxidante (cepa <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5).	68
Figura 23. Potencial de inhibición de la enzima hialuronidasa de los extractos crudos con presencia de pigmento y capacidad antioxidante de las cepas de <i>Gordonia hongkongensis</i> (a) Z9.2D8 y (b) G11.1D5. Cultivadas en medio GYM.	71
Figura 24. Cinética de inhibición de la enzima hialuronidasa de los extractos crudos con presencia de pigmento y capacidad antioxidante de la cepa <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8.	72
Figura 25. Cinética de inhibición de la enzima hialuronidasa de los extractos crudos con presencia de pigmento y con actividad antioxidante de la cepa <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5.	72
Figura 26. Potencial de inhibición de la enzima colagenasa de los extractos crudos con presencia de pigmento y actividad antioxidante de las cepas de <i>Gordonia hongkongensis</i> . (a) Z9.2D8 y (b) G11.1D5. Cultivadas en medio GYM.	73
Figura 27. Cinética de inhibición de la enzima colagenasa de los extractos crudos con presencia de pigmento y capacidad antioxidante de la cepa <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivada en medio GYM.	74
Figura 28. Cinética de inhibición de la enzima colagenasa de los extractos crudos con presencia de pigmento y capacidad antioxidante de la cepa <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5, cultivada en medio GYM.	74
Tabla 1. Diseño experimental de Plackett-Burman usado para la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8.	36
Tabla 2. Diseño experimental de Plackett-Burman usado para la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5.	37
Tabla 3. Condiciones de cultivo para maximizar la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes, de las cepas de <i>G. hongkongensis</i> (Z9.2D8 y G11.1D5), según el diseño Plackett-Burman.	47
Tabla 4. Diseño de superficie de respuesta Box-Behnken usado para mejorar la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8.	49
Tabla 5. Diseño de superficie de respuesta Box-Behnken usado para mejorar la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8.	51
Tabla 6. Condiciones de cultivo para mejorar la absorbancia del extracto crudo con presencia de pigmento y la capacidad antioxidante DPPH y ABTS, de las cepas de <i>G. hongkongensis</i> (Z9.2D8 y G11.1D5), según el diseño de superficie de respuesta.	65

Tabla S1. Diseño experimental de Plackett – Burman para la evaluación de los principales factores que influyen para la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes de las cepas de <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 y G11.1D5, cultivadas en medio GYM.	84
Tabla S2. Tabla S2. Diseño Box-Behnken de las tres principales variables significativas con efecto positivo en la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes de las cepas de <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 y G11.1D5, cultivadas en medio GYM.	85
Tabla S3. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman para absorbancia de extractos crudos producidos. La absorbancia de los extractos etanólicos fue medida a 490 nm. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.	86
Tabla S4. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman para absorbancia de extractos crudos producidos. La absorbancia de los extractos etanólicos fue medida a 490 nm. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.	87
Tabla S5. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman para la capacidad de captura de radicales DPPH de extractos crudos producidos medida a 515 nm. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.	88
Tabla S6. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman para la capacidad de captura de radicales DDPH de extractos crudos producidos medida a 515 nm. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.	89
Tabla S7. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman para La capacidad de captura de radicales ABTS de extractos crudos producidos medida a 735 nm. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.	90
Tabla S8. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman para La capacidad de captura de radicales ABTS de extractos crudos producidos medida a 735 nm. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.	91
Tabla S9. Análisis estadístico del diseño Box-Behnken para absorbancia de extractos crudos producidos medida a 490 nm. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.	92
Tabla S10. Análisis estadístico del diseño Box-Behnken para la producción de pigmento (absorbancia) de extractos crudos producidos medida a 490 nm. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.	93
Tabla S11. Análisis estadístico del diseño Box-Behnken para la capacidad de captura de radicales libres DPPH de extractos crudos producidos medida a 515 nm. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.	94
Tabla S12. Análisis estadístico del diseño Box-Behnken para la capacidad de captura de radicales DPPH de extractos crudos producidos medida a 515 nm. <i>G. hongkongensis</i>	

G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.....	95
Tabla S13. Análisis estadístico del diseño Box-Behnken para la capacidad de captura de radicales ABTS de extractos crudos producidos medida a 735 nm. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.....	96
Figura S1. Efecto del medio de cultivo sobre la biomasa producida (peso seco) en 10 días de incubación. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell.....	97
Figura S2. Efecto del medio de la fuente de carbono sobre la absorbancia (490 nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell.....	98
Figura S3. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de captura de radicales DPPH (515nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell.....	99
Figura S4. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de captura de radicales ABTS (735nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell.....	100
Figura S5. Efecto del medio de cultivo sobre la biomasa producida (peso seco) en 10 días de incubación. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivadas en medio GYM y Zobell.....	101
Figura S6. Efecto del medio de la fuente de carbono sobre la absorbancia (490 nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivadas en medio GYM y Zobell.....	102
Figura S7. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de captura de radicales DPPH (515nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivadas en medio GYM y Zobell.....	103
Figura S8. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de barrido de radicales ABTS (735nm) de los extractos etanólicos producidos en 10 días de incubación. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivadas en medio GYM y Zobell.....	104
Figura S9. Gráfico de probabilidad normal de los residuos generado a partir del diseño de superficie de respuesta para mejorar la producción de pigmento (absorbancia) de la cepa <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8.....	105
Figura S10. Gráfico de probabilidad normal de los residuos generado a partir del diseño de superficie de respuesta para mejorar la producción de pigmento (absorbancia) de la cepa <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5.....	106
Figura S11. Gráfico de probabilidad normal de los residuos generado a partir del diseño de superficie de respuesta para mejorar capacidad de captura de radicales DPPH del extracto crudo de la cepa <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8.....	107
Figura S12. Gráfico de probabilidad normal de los residuos generado a partir del diseño de superficie de respuesta para mejorar capacidad de captura de radicales DPPH del extracto crudo de la cepa <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5.....	108
Figura S13. Gráfico de probabilidad normal de los residuos generado a partir del diseño de superficie de respuesta para mejorar capacidad de captura de radicales ABTS del extracto crudo de la cepa <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8.....	109

Figura S14. Gráfico de probabilidad normal de los residuos generado a partir del diseño de superficie de respuesta para mejorar capacidad de barrido de radicales ABTS del extracto crudo de la cepa <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5.....	110
Figura S15. Comparación múltiple de tratamientos del efecto de la concentración del extracto etanólico crudo con presencia de pigmento y actividad antioxidante en la inhibición de la enzima colagenasa medida a 600nm. <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8 cultivadas en medio GYM.....	111
Figura S16. Comparación múltiple de tratamientos del efecto de la concentración del extracto etanólico con presencia de pigmento y actividad antioxidante en la inhibición de la enzima colagenasa medida a 600nm. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivadas en medio GYM.....	111
Figura S17. Comparación múltiple de tratamientos del efecto de la concentración del extracto etanólico con presencia de pigmento y con actividad antioxidante en la inhibición de la enzima hialuronidasa medida a 600nm. <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5 cultivadas en medio GYM.	112

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, les agradezco a mis padres, Remberto Rhenals M y Omaira Montoya A, quienes siempre me han brindado su apoyo y su amor incondicional, para poder cumplir todos mis sueños y metas y me han enseñado a nunca abandonarlos a pesar de las adversidades. También por brindarme el soporte material y económico para poder concentrarme en los estudios y nunca abandonarlos.

Le agradezco a mis compañeros y amigos, María Clara de la Hoz, Aixa Sarmiento y Marcelo Valle, por su amistad, su apoyo, su conocimiento y sus enseñanzas más allá de los conceptos técnicos. Gracias por las horas compartidas, los trabajos realizados en conjunto, las historias vividas y por convertirse en mis cómplices y hermanos.

Gracias a un gran compañero y mentor, Jeysson Sánchez, quien me brindó sin reparo todos sus conocimientos, su apoyo y me regaló miles de enseñanzas.

Gracias a mis tutores, Dr. Luis Eduardo Díaz y Dra. Luisa Villamil, por su guía y por permitirme participar en este proyecto.

Mis más sinceros agradecimientos para otro grupo de personas que nos enseñan, nos ayudan y nos apoyan cada día, los técnicos de laboratorio, infinitas gracias a Pili, Jorgito, María, Martica y Darío.

Finalmente, gracias a la Universidad de La Sabana por aceptarme en su Maestría en Diseño y Gestión de Procesos y permitirme crecer como profesional.

RESUMEN

Los pigmentos y compuestos antioxidantes son sustancias de alta demanda en la industria cosmeceútica. Aunque sus fuentes originales son naturales, en las últimas décadas han sido reemplazados por compuestos sintéticos debido a su menor costo. Sin embargo, es importante destacar que estos compuestos sintéticos suelen ser perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente debido a su toxicidad. Por esta razón, resulta crucial explorar alternativas para su producción de una forma más sostenible. Una alternativa prometedora es la obtención de metabolitos generados por microorganismos de la biodiversidad marina colombiana. Estos metabolitos han sido utilizados durante décadas debido no solo a su potencial biotecnológico, también importantes ventajas como la disponibilidad de materias primas sin depender de las variaciones estacionales, producción sostenible y una mayor concentración con una purificación más simple de los productos. Las *actinobacterias* son una gran fuente de ingredientes funcionales para cosméticos, como productoras de pigmentos con potencial bioactivo. El objetivo de este estudio fue optimizar la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes en dos cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5) a través de la implementación del diseño experimental de Plackett-Burman y la metodología de superficie de respuesta. En este proceso, se evaluaron ocho variables clave (concentración de inóculo, concentración de la fuente de carbono y nitrógeno, concentración de NaCl, pH, tiempo de incubación, temperatura y velocidad de agitación) mediante el diseño experimental de Plackett-Burman. Luego, se procedió a optimizar las variables independientes más influyentes (temperatura, concentración del inóculo y velocidad de agitación) mediante la implementación de un diseño Box-Behnken, con el fin de maximizar la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. Los resultados de este estudio revelaron mejoras significativas en la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes en dos cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5) mediante la aplicación del diseño experimental de Plackett-Burman y la metodología de superficie de respuesta. Comparando con las variables de respuesta obtenidas en el medio de aislamiento, la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 experimentó un aumento en la absorbancia de 0.091 a 0.32, en la capacidad de captura de radicales DPPH de 27.60% a 84.61%, y en la capacidad de captura de radicales ABTS de 17.39% a 79.77%. Por otro lado, la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 también presentó mejoras en sus variables de respuesta, con la absorbancia aumentando de 0.14 a 0.53, la capacidad de captura de radicales DPPH de 38.27% a 68.72%, y la capacidad de captura de radicales ABTS de 60.71% a 88.00%. En todos los casos, la precisión de la validación de los modelos matemáticos superó el 90%. Además, se evaluó el potencial cosmético (antienvejecimiento) de los extractos crudos con presencia de pigmento y con actividad antioxidante de ambas cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5), revelando valores de inhibición de la enzima colagenasa directamente proporcionales a la concentración del extracto. Es importante destacar que el extracto mejorado de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 mostró una inhibición significativamente mayor (28.25% a 3mg/ml y 27.79% a 1mg/ml) en comparación con el extracto original (17.01% a 3mg/ml y 14.58% a 1mg/ml). Similarmente, el extracto crudo de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 también demostró una inhibición mejorada, con un valor de 34.18% a 3 mg/ml y 25.52% a 1 mg/ml, superando al extracto original (29.62% a 3mg/ml y 25.52% a 1mg/ml). Además, ambas cepas mostraron la capacidad de inhibir la enzima hialuronidasa, lo que las convierte en ingredientes potenciales para productos cosméticos. Finalmente, se utilizó la metodología de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) para identificar

posibles sustancias responsables de las bioactividades de interés, revelando similitudes con aductos 2M+NH₄, correspondientes a compuestos carotenoides, conocidos por su actividad antioxidante y capacidad para inhibir enzimas cosméticas como la hialuronidasa y la colagenasa. En conclusión, este estudio ha evidenciado que la fermentación de cepas marinas de *G. hongkongensis* representa una alternativa sostenible, no tóxica y respetuosa con el medio ambiente para la producción de pigmentos y compuestos antioxidantes con potencial antienvjecimiento. Estos hallazgos demuestran la importancia crítica de elegir con precisión las condiciones de cultivo que puedan maximizar la generación de estos valiosos metabolitos, que gozan de una alta demanda en la industria cosmeceútica e invitan a continuar estudiando el potencial bioactivo de los microorganismos marinos y una posible producción de sus metabolitos, a nivel industrial.

INTRODUCCIÓN

El concepto cosmeceútica nace de la fusión entre la ciencia cosmética y la farmacéutica, con el objetivo de desarrollar productos cosméticos con ingredientes activos destinados a producir un efecto fisiológico beneficioso, resultante de una acción farmacológica mejorada, en comparación con un cosmético inerte (Sharmeen et al., 2021). El hallazgo de moléculas bioactivas, usualmente utilizadas en la industria farmacéutica, que otorguen nuevas y mejoradas propiedades terapéuticas a los productos cosméticos, es el gran reto de la cosmeceútica, para lograr satisfacer las expectativas de sus consumidores (Pérez et al., 2017). Las proteínas, vitaminas, antioxidantes, enzimas, pigmentos y colorantes son algunas de las sustancias más usadas en la industria cosmeceútica (Alcalde, 2007).

Los antioxidantes son aquellas sustancias capaces de proteger a los organismos y las células del daño inducido por el estrés oxidativo, el cual desempeña un papel importante en el desarrollo de muchas enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, artritis reumatoide, cáncer, enfermedades cardiovasculares y cutáneas (Anggraini et al., 2021). En la industria cosmética, los antioxidantes son utilizados con el fin de mitigar el envejecimiento y degradación de las células en la epidermis, como consecuencia del efecto del sol y otras condiciones medioambientales (Amores et al., 2018).

El daño oxidativo puede ser tratado tanto con antioxidantes naturales como sintéticos. Estos últimos, son los más utilizados en la industria debido a su bajo costo, estabilidad y alta capacidad de captura de los radicales libres, las cuales son especies químicas inestables producto del metabolismo celular. Sin embargo, varios estudios demuestran que el uso de algunos antioxidantes sintéticos, como la ter-butílohidroquinona (TBHQ), puede tener efectos secundarios sobre el cuerpo humano como intoxicaciones e incluso cáncer (Mohammadipanah & Momenilandi, 2018).

Por otro lado, los pigmentos son utilizados ampliamente, como aditivos en los productos farmacéuticos y cosméticos. Puesto que son los encargados de impartir color a los objetos, por acción de la refracción de la luz (Marcano, 2018). Estos pueden clasificarse en cuatro categorías: naturales, idénticos a los naturales, sintéticos e inorgánicos. En los últimos años, los consumidores se han interesado cada vez más por los pigmentos de origen natural, como alternativa para sustituir a los colorantes sintéticos; debido a que los pigmentos naturales poseen propiedades biológicas y efectos beneficiosos para la salud, además pueden proceder de plantas, insectos y microorganismos (Loh et al., 2020). Cabe resaltar que, en comparación con los procedentes de plantas y animales, la producción de pigmentos naturales por fermentación microbiana presenta importantes ventajas como la

disponibilidad de materias primas sin depender de las variaciones estacionales, producción sostenible y una mayor concentración con una purificación más simple de los productos (Zhu et al., 2020). Por lo anterior, es importante buscar fuentes sustitutas para la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes, los cuales sean de naturaleza no tóxica y representen alta viabilidad económica.

Dentro de estos microorganismos reportados como productores de pigmentos naturales, se destacan las *actinobacterias*, las cuales son bacterias Gram-positivas, ampliamente distribuidas en diversos ecosistemas como terrestres, acuáticos, entre otros y son reconocidas por su capacidad de producir metabolitos secundarios de importancia médica e industrial, como antibióticos, enzimas, antioxidantes, antimicrobianos, pigmentos, entre otros (Wink et al., 2017). Cabe resaltar que, la capacidad de estos organismos para producir pigmentos depende de las diversas condiciones de nutrición y cultivo, en las que puede aumentar mucho o perderse por completo. Por lo tanto, es muy importante mejorar la combinación adecuada de las diferentes condiciones de cultivo para fomentar el crecimiento y la producción de pigmentos (Selim et al., 2021).

JUSTIFICACIÓN

Colombia es un país privilegiado por la naturaleza con paisajes que tienen diversidad de plantas y animales, razón por la cual ha sido catalogado como uno de los países con mayor diversidad del mundo, precedido por Brasil y seguido por Indonesia, China y México (Bernal et al., 2015). El territorio colombiano con solo el 0.7% de la superficie continental posee cerca del 10% de la diversidad biológica mundial (Ministerio de medio ambiente & Humboldt, 1995); patrimonio invaluable que puede dar a nuestro país ventajas competitivas en el descubrimiento y desarrollo de principios activos para la industria farmacéutica y cosmética mediante el uso sostenible de nuestra biodiversidad (Bravo & Pereañez, 2016).

En 2014, el mercado mundial de productos cosméticos de origen natural fue alrededor de 33.000 millones de dólares, donde Brasil y el Pacífico asiático fueron las regiones de mayor crecimiento y los productos para el cuidado de la piel fueron los más demandados (Saintemarie & Matic, 2015). En América Latina, Colombia está bien posicionada en la producción y exportación de productos de maquillaje, cabello y limpieza. Sin embargo, estos productos tienen una presencia limitada en mercados atractivos como Europa, América del Norte, Asia Oriental y Asia del Sur. Cabe resaltar que el desempeño de la producción y exportación de Colombia en ingredientes naturales para uso cosmético es reducido, con una participación en la región inferior 3% (Ayala, 2015). (Ayala, 2015).

Por todo lo anterior, en las últimas décadas el gobierno colombiano ha promovido políticas en pro del crecimiento del sector cosmético y el desarrollo de productos basados en la biodiversidad, como la ley 165 de 1994 (política nacional de biodiversidad), la cual, se fundamenta en tres estrategias: conservación, conocimiento y utilización sostenible de la biodiversidad. Esta política se relaciona estrechamente con los objetivos de desarrollo sostenible (ODS), propuestos en el año 2015 por la Organización de las Naciones Unidas (ONU). Los cuales, en sus numerales 12 al 16, establecen la importancia de la producción y consumo sostenibles, las acciones en beneficio del clima, la vida submarina y los ecosistemas terrestres, como estrategia global para erradicar la pobreza, proteger el planeta y asegurar la prosperidad para todos (ONU, 2015).

Como se mencionó anteriormente, algunos ingredientes cosméticos como los pigmentos y antioxidantes sintéticos generan preocupaciones sanitarias y medioambientales, siendo rechazados por la FDA. Por ejemplo, el amarillo ocaso y la tartrazina provocan efectos alérgicos, la bendizina provoca cáncer de intestino, y el negro de humo, muy utilizado como tinta de imprenta, también es potencialmente cancerígeno (Narsing Rao et al, 2017). Razón por la cual, son preferidos los ingredientes naturales microbianos debido a sus ventajas de producción y diversas actividades biológicas, como antimicrobianas, anticancerígenas, antioxidantes y antituberculosas (Venil et al., 2020) (Celedón & Díaz, 2021). Logrando incorporarse en mercados en expansión como el de pigmentos, el cual, fue valorado en 2020 en más de 32900 millones de dólares y una proyección de crecimiento del 5.1% entre 2021 y 2028 o el mercado de antioxidantes, que para el mismo año fue valorado en 86 billones de dólares (Kumar et al., 2022).

En virtud de lo anterior, es importante para el desarrollo industrial, generar una solución altamente eficiente y de bajo costo que permita suplir la demanda del mercado, mediante alternativas más sostenibles y no tóxicas, como la fermentación de *actinobacterias*, las cuales, son ampliamente conocidas por ser responsables de la producción de más del 45% de los 22.500 compuestos microbianos biológicamente activos, utilizados en farmacéutica (Abraham & Chauhan, 2018).

Estudios recientes demuestran los ecosistemas marinos y su diversidad microbiana pueden albergar más de 1400 especies desconocidas de *actinobacterias* (Kumar Patra et al., 2020), lo cual, podría representar nuevos compuestos bioactivos para el mercado, provenientes de especies poco estudiadas como el género *Gordonia*. Originalmente consideradas como patógenos oportunistas en humanos (Sowani et al., 2017), sin embargo, en los últimos años este género ha atraído un creciente interés, debido a su capacidad de biodegradar contaminantes ambientales, así como transformar y sintetizar compuestos orgánicos, haciendo que estas bacterias sean potencialmente útiles para la aplicación ambiental e industrial (Ortega-Cabello et al., 2017) (Sánchez-Suárez et al., 2022).

Considerando lo mencionado, se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles fueron las condiciones de cultivo que favorecieron la biosíntesis de pigmentos y metabolitos antioxidantes en cepas de *Gordonia hongkongensis* aisladas del medio marino para su posible aplicación en la industria cosmética?

OBJETIVOS

Objetivo general: Determinar las condiciones de cultivo que mejoren la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes de cepas de *Gordonia hongkongensis* marinas para su posible aplicación en la industria cosmética.

Objetivos específicos:

- Establecer las condiciones de cultivo que permitan incrementar la producción de pigmentos y de metabolitos antioxidantes de cepas de *Gordonia hongkongensis* aisladas del medio marino.
- Identificar los compuestos responsables de las bioactividades, presentes en los extractos crudos con presencia de pigmento y capacidad antioxidante como parte de la caracterización química de los mismos.

- Evaluar el potencial de inhibición de la actividad hialuronidasa y/o colagenasa, de extractos crudos de *Gordonia hongkongensis* con actividad antioxidante como propiedades deseables en la industria cosmética.

CAPÍTULO 1: ESTADO DEL ARTE

La invención de síntesis de pigmentos, a nivel de laboratorio, nace como consecuencia de la necesidad de la industria de encontrar productos que reemplazaran los costosos pigmentos de origen natural. Uno de los primeros pigmentos sintéticos modernos (Azul de Prusia) fue descubierto en 1704 y posterior a este hallazgo fueron sintetizados con éxito muchos otros pigmentos. Lo cual permitió a la industria química, ofrecer una gran gama de pigmentos de bajo costo, con buena capacidad de tintado y más altos estándares de calidad y consistencia, en la composición y durabilidad de los colores (San Andrés et al., 2010).

A finales del siglo XX, la obtención biotecnológica de pigmentos adquirió gran interés dentro de la industria, debido a la capacidad que presentan algunos microorganismos para producir diversos pigmentos, así como sus destacables ventajas frente a otros métodos de obtención, puesto que estos al ser de origen biológico, son más sostenibles y de fácil acceso. Adicionalmente, su producción no depende de las condiciones ambientales y se pueden lograr altos rendimientos y pureza de los mismos (Morones Ramírez et al., 2015). Los microorganismos son capaces de producir pigmentos versátiles como la prodigiosina, la zeaxantina, la astaxantina, el licopeno, el β -caroteno y la melanina (Ghattavi et al., 2022). Estos compuestos coloreados se han utilizado en muchas áreas industriales diferentes, como la alimentación, los textiles, los cosméticos y los productos farmacéuticos. (Ezquerbrauer & Chan-higuera, 2021). Numerosos estudios han demostrado que las *actinobacterias* producen pigmentos, que pueden ser de color rojo, amarillo, naranja, rosa, pardo, marrón claro, marrón verdoso, azul o negro, dependiendo de la cepa, el medio utilizado y la edad del cultivo (Barka et al., 2016). et al., 2016).

Uno de los géneros de *actinobacterias* más importantes en la producción de metabolitos secundarios, en especial de compuestos coloreados, son los *Streptomyces* (Sarmiento-tovar et al., 2022). Debido a su gran capacidad reproductiva y a que poseen una distribución genética fascinante, que resulta atractiva para su replicación en la industria biotecnológica. Algunas de estas sustancias pigmentadas pueden presentar bioactividades útiles para diferentes industrias. Por ejemplo, la especie *Streptomyces aureofaciens* ha sido identificada como responsable de la biosíntesis del pigmento azul, indigoidina (Knirschova et al. 2015); la *Streptomyces hygroscopicus* produjo un pigmento amarillo (en medio peptona-extracto de levadura-hierro) con actividad antibiótica contra *Shigella 15orm*. El pigmento biológico actinorhodina es producido por *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces violaceusruber* y *Streptomyces lividans*; Este pigmento tiene diferentes aplicaciones como antibiótico contra bacterias Gram positivas e indicador en agentes de laboratorio, por su capacidad de mostrar colores especiales en medio ácido y alcalino (Selim et al., 2021). Actualmente, en la industria cosmética, pigmentos microbianos como la prodigiosina y la violaceína de *Streptomyces marcescens* se utilizan como ingrediente en protectores solares debido a su capacidad antibacteriana y antioxidante, que es similar a la del ácido ascórbico (Reis-Mansur et al., 2019; Solano, 2020; Kumar et al., 2021). Otros pigmentos de *actinobacterias* también han sido registrados con actividad antioxidante como las melaninas, color marrón y negro, producidas por cepas de las especies *Streptomyces glaucescens* KCTC988 (%ABTS:25.08), *Streptomyces glaucescens* NEAE-H (%ABTS:70)

y *Streptomyces* sp. ZL-24 (%DPPH:65); la eumelanina de una de *Streptomyces parvus* BSB49 (%DPPH:88 - %ABTS: 75) y la prodigiosina producida por *Streptomyces* sp. WMA-LM31 (%DPPH:88) (Sarmiento-tovar et al., 2022), un pigmento que desempeña un papel fundamental en la protección de la piel y además, ha despertado recientemente el interés de los científicos por sus propiedades químicas, físicas y biológicas (Ezquerria-brauer & Chan-higuera, 2021).

Otras especies de *actinobacterias* como *Arthrobacter agilis* y *Arthrobacter psychrochitiniphilus* *Zobellia laminarie*, producen pigmentos protectores frente a los rayos UV que pueden resistir la radiación UV-B y -C, protegiendo la piel (Choksi et al., 2020) (Silva et al., 2019). Algunas cepas de *Gordonia* sp. Como la cepa IB de *Gordonia alkanivorans* sintetiza luteína, cantaxantina y astaxantina (Fernandes et al., 2018), mientras que la cepa *Gordonia terrae* TWRH01 fue reportada por la producción intracelular de pigmentos carotenoides, principalmente equinenona y adonixantina 30-b-D-glucósido (Loh et al., 2020). Una cepa de *Micrococcus roseus* (cultivada en medio glucosa-peptona-levadura), presentó capacidad de producción de carotenoides intracelulares, los cuales, fueron extraídos mediante rompimiento de la pared celular bacteriana y caracterizados mediante análisis espectrofotométrico (Yolmeh et al., 2017).

Cabe resaltar, que los distintos tipos de carotenoides nombrados también son pigmentos orgánicos, liposolubles, de color amarillo, naranjado o rojo, con diversas propiedades bioactivas y químicas. Pueden ser antioxidantes, precursores de vitaminas, actuar como transportadores de oxígeno, tener propiedades antitumorales y antimicrobianas, etc. Por este motivo, los carotenoides generan interés en industrias como la farmacéutica, nutracéutica, de aditivos para alimentos/piensos, textil, cosmética y química fina (Fernandes et al., 2018).

El término antioxidante se dio a conocer en la etapa final del siglo IXX y en los inicios del siglo XX, para referirse específicamente a compuestos químicos que prevenían la unión al oxígeno y estaban vinculados al proceso de la corrosión de los metales, la vulcanización de la goma, la polimerización de los derivados del petróleo y el ensuciamiento de la maquinaria de combustión interna. Posteriormente, se aplicó este concepto a la industria de la alimentación y finalmente, a las células de organismos vivos (Jácome Roca, 2017). Estas sustancias capaces de neutralizar los radicales libres, pueden ser naturales o sintéticos. Siendo estos últimos los más utilizados en la industria por su rendimiento, estabilidad y bajo costo (Birch-Machin & Bowman, 2016).

Como se mencionó anteriormente, estudios realizados en *actinobacterias* demuestran que estos producen eficazmente una variedad de moléculas bioactivas incluyendo antioxidantes (Ezquerria-brauer & Chan-higuera, 2021).

Kawahara et al. (2012), llevaron a cabo un programa que tenía como objetivo la evaluación de antioxidantes de *actinobacterias*, de los cuales se aislaron numerosos compuestos. Los metabolitos producidos por la cepa *Streptomyces prunicolor* incluían principalmente bentocianinas A, B, C y bentofenina, los cuales, demostraron buen potencial antioxidante. En el mismo estudio, se encontró que *Nocardioopsis alba* poseía la capacidad de producir compuestos antioxidantes como (Z)-1-((1-hidroxipenta-2,4-dien-1-il)oxi) antraceno-9,10-diona y *Streptomyces misionensis*, produjo sustancias con una fuerte capacidad antioxidante sobre los radicales libres de óxido nítrico, DPPH y peróxido de hidrógeno (Chandra et al., 2020). *Streptomyces* sp. Produjo diferentes isoflavonoides antioxidantes como 4', 7, 8-trihidroxisoflavona (Rakesh et al., 2013). *Streptomyces lydicus* A2

(Lertcanawanichakul, Pondet y Kwantep, 2015), *Streptomyces* spp. SRDP-H03 (Kn et al., 2016) y BI244 también mostraron actividad antioxidante ensayada mediante DPPH.

Recientemente, el medio marino ha proporcionado una gran variedad de compuestos inéditos con una prometedora aplicabilidad farmacéutica, incluyendo moléculas antioxidantes (Beygmoradi & Homaei, 2018). Cheng et al (2016) registró la producción de una nueva quinolona clorada de *Streptomyces* sp. SBT345, aislada de una esponja marina del Mediterráneo, que demostró su potencial antioxidante. Ramalingam y Rajaram (2016), aislaron la cepa *Streptomyces variabilis* KP149559 a partir de muestras de mucosa del coral *Acropora formosa* y purificaron un compuesto hidroxilado producido por esta *actinomicetota*, con un porcentaje de barrido que varía entre el 75 y el 82% a una concentración de 0,5 mg/MI. En el trabajo dirigido por Manimaran y Kannabiran (2017), se pudo observar que *Streptomyces* sp. VITMK1 producía una diketopiperazina, que eliminaba más del 70% de los radicales DPPH y óxido nítrico a 500 µg/MI. Ravi et al (2017), aislaron la Gancidina W del extracto clorofórmico de *Streptomyces paradoxus* VITALK03 que a 1 mg/MI exhibió un porcentaje antioxidante del 34%, 48% y 61,5% cuando se evaluó mediante DPPH, ABTS*+, y el radical superóxido (De Oliveira et al., 2021).

Estos pigmentos y antioxidantes naturales pueden ser suministrados a la piel a través de los cosméticos, los cuales actúan sobre la epidermis o sus capas más externas, y tienen una gran importancia desde el punto de vista de la función y la apariencia. Razón por la cual, ha cobrado un gran interés la búsqueda de ingredientes funcionales procedentes de recursos naturales que sean aplicables a los productos para el cuidado de la piel, capaces de inhibir ciertas enzimas degradadoras de proteínas de la matriz extracelular producida por las células del tejido conectivo de la dermis de la piel, como el colágeno y el ácido hialurónico, las cuales previenen el envejecimiento prematuro de la piel.

Los inhibidores enzimáticos se consideran cada vez más como herramientas valiosas, no sólo para el estudio de las estructuras enzimáticas y los mecanismos de reacción, sino también para su uso potencial en la industria farmacológica y cosmética. Las *actinobacterias* marinas son fuentes prometedoras para la producción de inhibidores enzimáticos (Selim et al., 2021).

Li et al., (2020) aislaron una hialuronidasa termoestable, adecuada para su aplicación en la difusión de fármacos y como una herramienta para producir oligosacáridos de ácido hialurónico (AH), procedente de *Thermasporomyces composti* DSM22891. La cual, fue más activa a 70 °C, y conservó alrededor del 30% de la actividad inicial tras incubarse a 60 °C durante 28 días y pH de 5.93. En general, los resultados mostraron que la TcHly8C es la primera hialuronato liasa de tipo exo PL8 con alta termoestabilidad, lo que proporciona una enzima potencialmente utilizada en medicina y en la producción de oligosacáridos de ácido hialurónico.

La inhibición de la enzima colagenasa es otra bioactividad valiosa en la cosmeceútica debido a que esta es la encargada de la degradación del colágeno. Esta molécula es la encargada de dar estructura, firmeza y elasticidad a la piel y mantiene la salud de tus músculos, ligamentos, tendones y articulaciones (Melo Saca, 2019). La aranciamicina fue aislada por primera vez en 1970 por Keller Schierlein et al. A partir de *Streptomyces echinatus*. Esta sustancia y sus derivados tienen una acción inhibitoria contra la colagenasa, que es fundamental para la metástasis tumoral y la artritis. También tiene una actividad antimicrobiana moderada contra *B. subtilis* y *M. bovis* BCG (Cheema et al., 2021).

CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA

A continuación, se describen las actividades y técnicas mediante las cuales se llevó a cabo el mejoramiento de la bioproducción de pigmentos y metabolitos antioxidantes generados por *actinobacterias* marinas, para su aplicación en la industria cosmeceútica:

2.1. Selección de cepas:

El Grupo de Investigación en Bioprospección de la Universidad de La Sabana cuenta con 200 *actinobacterias* aisladas del medio marino de la bahía de Santa Marta, Magdalena. Las cuales, han sido cultivadas en medios “*Glucose Yeast Media* – GYM” (Smaoui et al., 2018) (composición g/L: glucosa (PanReac Cas.No.:50-99-7), 4; extracto de levadura (Oxoid LP0021), 4; extracto de malta (Neogen NCM0207A); 10; NaCl (Honeywell Cat.31434), 24; MgCl₂ (PanReac CAS-No.:7791-18-6), 5.3; KCl (PanReac Cas-No.:740-61), 0.7; CaCl₂ (PanReac CAS-No.:10043-52-4), 0.1; Ph, 7.4±0.2) y “Zobell” (Wu et al., 2018) (composición g/L: extracto de levadura (Oxoid LP0021); 1.25; Peptona (PanReac CAS-No.:91079-40-2), 3.75; NaCl (Honeywell Cat.31434), 18; MgCl₂ (PanReac CAS-No.:7791-18-6), 2; KCl (PanReac Cas-No.:740-61), 0.525; CaCl₂ (PanReac CAS-No.:10043-52-4), 0.075; pH: 7.4±2), se obtuvo su registro fotográfico y se conservaron criogénicamente (-80°C). Dos aislados previamente identificados, mediante secuenciación del gen RNA ribosomal 16S, con presencia de pigmento y capacidad antioxidante y sin actividad citotóxica frente a líneas celulares de fibroblastos humanos, constituyeron la población de estudio de la presente investigación (Sánchez-Suárez et al., 2021). Las *actinobacterias* de interés fueron reactivadas en el medio de crecimiento, en estado sólido e incubados por 7 días a 30°C (New Brunswick Scientific, Connecticut USA). Una vez finalizó el tiempo de incubación, los aislados que presentaron producción de pigmento intracelular, color naranja, fueron cultivados en el mismo medio, en estado líquido (3, 10 y 100ml), durante 7 días, a 30°C y 150 rpm (New Brunswick Scientific, Connecticut USA). La biomasa obtenida de este proceso fue liofilizada (Labconco, Kansas USA) y utilizada en las fermentaciones posteriores.

2.2. Selección del medio de cultivo:

Con el objetivo de seleccionar el medio de cultivo que permitiera obtener una mayor concentración de biomasa y una mejor bioproducción de pigmentos y metabolitos antioxidantes, cada una de las cepas fueron cultivadas en su medio de crecimiento y en medio GYM o Zobell, durante un periodo de 10 días, a 30°C y 150 rpm (New Brunswick Scientific, Connecticut USA). Asegurándose de agregar a cada medio la misma cantidad de biomasa liofilizada, los experimentos se realizaron por triplicado. El medio seleccionado fue aquel en el cual se obtuvieron mejores resultados de producción de biomasa, concentración de pigmento (absorbancia del extracto crudo) y capacidad de captura de radicales libres DDPH y ABTS. Las fuentes de carbono y nitrógeno se evaluaron como se describe a continuación. Cabe mencionar que en todos los casos se midió la cantidad de biomasa producida, con el fin de evaluar si la producción de metabolitos dependía directamente de la cantidad de biomasa producida.

2.3. Preparación de las fermentaciones variando las fuentes de carbono y de nitrógeno:

Con el fin de mejorar la bioproducción de pigmentos y metabolitos antioxidantes, en primer lugar, se cultivaron las cepas de interés en el medio seleccionado, modificando las fuentes de carbono (glucosa (PanReac Cas.No.:50-99-7), sacarosa (Incauca), almidón (Carlo Erba Cas.No.: 9005-84-9), glicerol (Chemi Cas: 56-81-5) y lactosa (PanReac Cas.No.:10039-26-6)). Una vez establecida la fuente de carbono, se procedió a variar la fuente de nitrógeno (úrea (PanReac Cas.No.:5713-6), extracto de malta (Neogen NCM0207A), extracto de levadura (Oxoid LP0021), caseína, nitrato de amonio (PanReac Cas.No.:7783-20-2) y peptona (PanReac CAS-No.:91079-40-2), conservando los otros componentes, concentraciones del medio. Asegurándose de agregar a cada ensayo la misma cantidad de biomasa liofilizada, los experimentos se realizaron por triplicado y fueron incubados (New Brunswick Scientific, Connecticut USA) durante 7 días a 30°C y 150 rpm. Aquellos medios en los que no creció el aislado o no se produjo el pigmento, fueron descartados. Por último, se evaluó el crecimiento bacteriano mediante la biomasa seca, la producción de pigmentos mediante la absorbancia del extracto etanólico y la capacidad antioxidante mediante la captura de radicales DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS (2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), con el fin de seleccionar el medio que presentara mejores resultados en las tres variables respuesta mencionadas.

2.4. Obtención del extracto crudo:

La biomasa obtenida en los cultivos bacterianos fue previamente separada del medio fermentado con la ayuda de una máquina centrífuga (Thermo scientific, Connecticut USA), a 20°C y 5000 rpm/min durante 5 minutos. Una vez retirado el sobrenadante, la biomasa fue congelada (Biomemory, Francia) durante 12 horas, a -80°C y posteriormente liofilizada (Labconco, Kansas USA) durante 24 horas, a -57°C y 0.22 mBar. Los extractos se prepararon a partir de la biomasa, utilizando etanol al 96% (MilliporeSigma) y extracción asistida por ultrasonidos (EAU) (Heidolph, Alemania) a 30HZ durante 11 minutos, para asegurar el rompimiento de la pared celular y la extracción de pigmentos. El disolvente se eliminó mediante un evaporador rotativo (Heidolph, Alemania) a 30°C y 50 mbar durante 30 minutos. Estos extractos se utilizaron para la evaluación de las actividades biológicas.

2.5. Determinación de la concentración del pigmento en extracto crudo:

La medición del color del extracto crudo se realizó mediante espectrofotometría ultravioleta visible (ThermoScientific (Waltham, MA USA)), para la determinación de la mayor longitud de onda a la cual absorbe cada extracto crudo. La determinación de la concentración del pigmento en los extractos crudos se llevó a cabo en placas de 96 pozos (Bio-Rad, California USA), a una concentración de 5mg/ml, para cada caso, puesto que a esta concentración se determinó la longitud de onda a la cual absorbe el extracto crudo. Considerando el valor de la absorbancia, directamente proporcional a la concentración del pigmento, según lo expuesto por la ley de Beer-Lambert (Fatemeh Mollaamin & Majid Monajjemi, 2020), se buscará maximizar la absorbancia del extracto crudo, como variable respuesta.

2.6. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto crudo:

2.6.1. Capacidad de captura de radicales ABTS:

La capacidad de captura de radicales libres de cada extracto se determinó mediante el ensayo de decoloración del catión radical ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-

sulfónico) (ABTS*) (MilliporeSigma (St. Louis, MO, USA)). El catión radical ABTS (ABTS*) se produjo haciendo reaccionar la solución *stock* de ABTS con 2,45 mM de persulfato de amonio (MilliporeSigma (St. Louis, MO, USA)). La determinación se llevó a cabo en placas de 96 pozos añadiendo 10 μ L de la muestra y 190 μ L de la solución de ABTS. La incubación se llevó a cabo durante 30 min, en la oscuridad y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 735 nm (Bio-Rad, California USA), utilizando trolox ((ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico)) (MilliporeSigma (St. Louis, MO, USA)) como control positivo, según lo planteado por Kemung et al (2020), en concentraciones entre 25 μ M y 0.39 μ M.

$$\text{Capacidad de captura de radicales ABTS (\%)} = \frac{A-B}{A} * 100 \quad (1)$$

A: Absorbancia del control

B: Absorbancia de la muestra

2.6.2. Capacidad de captura de radicales DPPH:

La capacidad de captura de los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) se midió haciendo reaccionar una solución madre de DPPH a 0.2 mM (MilliporeSigma (St. Louis, MO, USA)) con el extracto de interés durante 30 minutos, en la oscuridad. La determinación se llevó a cabo en placas de 96 pozos, añadiendo 100 μ L de la muestra y 100 μ L de DPPH. La absorbancia fue medida a 515 nm (Bio-Rad, California USA) y se utilizó trolox ((ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico)) (MilliporeSigma (St. Louis, MO, USA)) como control positivo, según lo planteado por Kemung et al (2020), en concentraciones entre 50 μ M y 0.39 μ M:

$$\text{Capacidad de captura de radicales DPPH (\%)} = \frac{A-B}{A} * 100 \quad (2)$$

A: Absorbancia del control

B: Absorbancia de la muestra

2.7. Evaluación de los principales factores que influyen en la producción de los pigmentos y metabolitos antioxidantes:

Una vez establecida la fuente de carbono y nitrógeno, se realizó la evaluación de los principales factores que influyen en la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. Las variables nutricionales a evaluar para las cepas fueron: concentración de inóculo, concentración de la fuente carbono y nitrógeno, concentración de NaCl, pH, temperatura, velocidad de agitación y tiempo de crecimiento.

El diseño experimental estadístico de Plackett-Burman permitió identificar los parámetros fisicoquímicos requeridos para el mejoramiento en la bioproducción de pigmentos y metabolitos antioxidantes (variables respuesta) (El-Naggar et al., 2015). El presente modelo está basado en un modelo de primer orden, con n+1 experimentos. Donde “n” es el número de variables y “Y” es la variable respuesta o variable independiente, es el intercepto del modelo, β_i es el coeficiente de regresión, y x_i es la variable independiente (Yun et al., 2018).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i * X_i \quad (3)$$

Cada una de las variables citadas anteriormente está representada en dos niveles, alto (+1) y bajo (-1). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La Tabla S1, realizada en Minitab 18, muestra el diseño experimental que fue llevado a cabo. Considerando que las cepas de *actinobacterias* fueron aisladas del medio marino, los niveles de fueron seleccionados realizando una variación del medio de aislamiento (GYM) y tratando de simular un medio de cultivo equivalente, con el fin de estimular su crecimiento y la producción de metabolitos secundarios. Autores como Loh et al., (2020) afirman que el crecimiento celular de las bacterias marinas y la producción de carotenoides están directamente relacionados con la concentración de NaCl en el medio de cultivo. Por esta razón, se optó por utilizar un rango de concentraciones que abarca desde 20 hasta 40 gramos de NaCl por litro de cultivo, abarcando tanto la concentración del medio de aislamiento (20 g/L) como la concentración de NaCl presente en el mar (35 g/L) según lo señalado por Cházaro-Olvera et al., (2021). En el mismo estudio, se descubrió que las cepas de *Gordonia Terrae* marinas producían una mayor cantidad de carotenoides cuando el pH del medio se situaba entre 5 y 7 Loh et al., (2020). Esto se tuvo en cuenta considerando que el pH del medio de aislamiento es de 7.5, un valor que corresponde a la salinidad del mar. Por lo tanto, se seleccionaron los niveles de pH 5 y 7 como parte del diseño experimental. Además, Sarmiento-tovar et al. (2022), en su investigación sobre la producción de pigmentos en *actinobacterias*, identificaron que la temperatura óptima para la producción de varios tipos de pigmentos era de 30°C, temperatura que concuerda con las condiciones de aislamiento. Esto se fundamenta en el hecho de que autores como Cházaro-Olvera et al., (2021) habían documentado variaciones en la temperatura del mar caribe colombiano, situándola entre 26°C y 32°C. Por tanto, se consideraron los niveles experimentales de 20°C y 30°C, con base a estos hallazgos. Asimismo, la elección del tiempo de incubación se basó en la intención de poner a prueba la hipótesis de que la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes guardaba una relación directamente proporcional con el tiempo de incubación (Fernandes et al., 2018). Por lo tanto, se optó por dos intervalos de tiempo: 7 días (como el periodo de incubación inicial) y 14 días.

Para la velocidad de agitación, se decidió examinar un amplio espectro de valores que abarcaba desde 80 rpm hasta 180 rpm. Esto se realizó con el propósito de investigar la relación entre el crecimiento y la agitación, y así determinar si un estado de agitación mínima, similar a un estado de reposo, o un estado de agitación más elevado era más adecuado para el aumento de la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. El rango de concentración de inóculo (0.5 g/L - 1.0 g/L) se definió considerando dos puntos equidistantes, uno superior y otro inferior, a la concentración de inóculo empleada en las condiciones de aislamiento (0.75 g/L). Con base en la misma premisa, se estableció el rango de concentración de fuente de carbono para el diseño experimental (2g/L – 6g/L), como dos puntos equidistantes a la concentración de inóculo empleada en el medio de aislamiento (4g/L), con el fin de estudiar si la concentración de esta fuente es directa o inversamente proporcional a la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes.

El intervalo de concentración de la fuente de nitrógeno (7 g/L - 14 g/L) se estableció teniendo en cuenta no sobrepasar las concentraciones óptimas señaladas por autores como Loh et al., (2020) y Alves & Paixão, (2014) en la producción de carotenoides a partir de cepas de *Gordonia* a 16°C. Por lo tanto, se seleccionó la concentración de la fuente de nitrógeno del medio de aislamiento (14 g/L) como el límite superior, y la mitad de este valor como el límite

inferior. Esto se llevó a cabo con el propósito de abarcar un amplio rango que permitiera un análisis exhaustivo del impacto de la fuente de nitrógeno en el incremento de la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes.

2.8. Análisis de superficie de respuesta:

Este paso implica la optimización de los niveles y los efectos de interacción entre las diversas variables significativas que ejercen un efecto en el mejoramiento de la bioproducción de pigmentos y metabolitos antioxidantes mediante el uso de un diseño Box-Behnken. El cual, es un diseño eficaz utilizado para la experimentación secuencial, proporciona cantidades apropiadas de información para realizar pruebas de la bondad del ajuste y no requiere un gran número de puntos de diseño, reduciendo así el costo global asociado al experimento (El-Naggar et al., 2015). Para este caso, en el diseño experimental se analizaron tres factores a tres niveles diferentes, bajo (-1), medio (0) y alto (+1) y se realizaron por triplicado. Lo anterior, con el fin de ajustar los resultados a un modelo polinómico de segundo orden independiente (Yun et al., 2018):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (4)$$

Donde Y es el valor de respuesta predicho, β_0 es el coeficiente del término constante, β_i es el coeficiente del término primario, β_{ii} es el coeficiente del término cuadrático y x_i es la variable independiente. La relación entre x_i y el valor real de la variable independiente X_i es la siguiente:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta x} \quad (5)$$

X_0 es el valor verdadero de la variable independiente en el punto central de la prueba, y Δx es el cambio de paso de la variable independiente. La Tabla S2 muestra el diseño experimental llevado a cabo, desarrollado en Minitab 18.

2.9. Análisis estadístico de los modelos:

En el análisis estadístico del modelo, los resultados fueron calculados como el promedio \pm desviación estándar (SD) y la significancia estadística se calculó usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA), para evaluar la hipótesis nula (las medias de todos los tratamientos son iguales). Los datos se consideraron significativamente diferentes cuando el nivel de significancia sea inferior al 5% ($P < 0,05$), la superioridad de la ecuación del modelo polinómico se evaluó determinando el coeficiente R y la significación estadística se definió mediante la prueba F.

2.10. Evaluación de los compuestos presentes en los extractos crudos con presencia de pigmento y capacidad antioxidante, responsables de las bioactividades:

La evaluación de los posibles compuestos responsables de las bioactividades, presentes en los extractos crudos con presencia de pigmento y capacidad antioxidante fue realizada mediante cromatografía líquida de baja resolución acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS).

Los extractos secos fueron disueltos en etanol y sometidos a análisis mediante la citada técnica cromatográfica, en un sistema LCM2020 (Shimadzu Corp, Japón) equipado con un analizador de cuadrupolo simple y una fuente de iones de electrospray (ESI). Adicionalmente, se utilizó ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo y ácido fórmico al 0,1% en agua, como fases móviles A y B, respectivamente. La elución en gradiente se realizará de la siguiente manera: 0 min, 10% A; 3 min, 10% A; 14 min, 40% A; 21 min, 70% A; 25 min, 100% A; 30 min, 10% A y la ESI fue operada simultáneamente en modo de iones positivos y negativo (barrido 200-800 m/z; 250° C CDL temperatura; voltaje del detector de 1,2 Kv; tasa de flujo de gas de nebulización de 1,3 L min. De flujo de gas; 8,0 L min de flujo de gas de secado) (Ramirez-Rodriguez et al., 2018).

2.11. Determinación de la capacidad inhibidora de la enzima colagenasa del extracto crudo:

La inhibición de la actividad de la colagenasa fue medida mediante la metodología establecida por Thring et al (2009), con algunas modificaciones. El ensayo se realizó disolviendo 10 ml de colagenasa de *Clostridium histolyticum* (Sigma C8051, USA) (2 U/ mL en agua destilada fría), 60 mL de tampón Tricina (Sigma Aldrich CAS.57-04-04-01, USA) (50 mM; pH 7.5; 10 mM de CaCl₂ y 400 mM de NaCl) y 30 mL de extracto a diferentes concentraciones (1, 3, 5, 7 y 9 mg/ml). Las mezclas fueron incubadas durante 20 minutos a 37°C (Fricell, Usa). Después del tiempo de incubación, 20 µL de sustrato N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-leu-gly-Pro-Ala (Sigma F5135, USA) (1 mM en tampón Tricina) fue añadido. La absorbancia a 600 nm fue medida inmediatamente después de añadir el sustrato (Bio-Rad, California USA) (Utami et al., 2018) y la actividad anticolagenasa se evaluó en porcentaje de inhibición (%) mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición colagenasa} = \frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control}} * 100\% \quad (6)$$

El ácido oleanólico (Sigma Aldrich CAS.508-02-1, USA) se utilizó como control positivo. Se realizaron tres experimentos independientes, repetidos por triplicado.

El solvente utilizado en las diluciones (etanol) fue utilizado como blanco, con el fin de corroborar que este no ejercía ningún tipo de inhibición sobre la enzima estudiada.

2.12. Determinación de la capacidad inhibidora de la enzima hialuronidasa del extracto crudo:

La actividad inhibidora de la hialuronidasa del extracto se midió mediante un ensayo espectrofotométrico, acorde al método descrito por Chaiyana et al. (2020) con ligeras modificaciones. En primer lugar, se preparó una solución de hialuronidasa de 15 unidades/ml (Sigma Aldrich CAS.37326-33-3, USA), disolviendo hialuronidasa de testículos bovinos en 20 Mm de buffer fosfato (Thermo Fisher Scientific Inc.003002 (Waltham, MA USA)), a pH 5.35, la cual contenga 0,01% p/v de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma Aldrich CAS. 9048-46-8, USA) y 77 mM de NaCl (Honeywell Cat.31434). Posteriormente, se añadieron 20 µL del extracto de interés a diferentes concentraciones (1, 3, 5, 7 y 9 mg/ml) y 100 µL de solución de hialuronidasa, en una placa de 96 pozos y se incubaron a 37°C durante 10 minutos (Fricell, USA). A continuación, se añadieron 100 µL de ácido hialurónico (Sigma Aldrich CAS. 9067-32-7, USA) al 0,03% p/v en tampón fosfato a pH 5,35

y se incubaron de nuevo a 37°C, durante 45 minutos. Posterior a la incubación, la mezcla de reacción se sumergió en un baño de agua en ebullición, durante 5 minutos para detener la reacción enzimática. Una vez enfriada a temperatura ambiente, se inició la reacción de Morgan-Elson mediante la adición de 100 μ L de reactivo de tetraborato de sodio 0.2 M (Sigma Aldrich CAS. 1330-43-4, USA). Se sometió nuevamente la mezcla a un calentamiento durante 3 minutos, en un baño de agua en ebullición y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 100 μ L de p-dimetilaminobenzaldehído 67 mM (Sigma Aldrich CAS. 100-10-7, USA) y se incubó nuevamente a 37°C por 20 minutos, hasta desarrollar color. La absorbancia UV de la mezcla resultante se midió a 595 nm (Bio-Rad, California USA) (Takahashi et al., 2003).

La actividad inhibidora de la hialuronidasa se calcula mediante la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición Hialuronidasa} = \frac{(A-B)}{A} * 100\% \quad (7)$$

Donde A es la absorbancia UV de una mezcla que contiene 20 μ L de agua destilada, 100 μ L de solución de hialuronidasa y 100 μ L de solución de ácido hialurónico; B es la absorbancia UV de una mezcla que contiene 20 μ L de extracto, 100 μ L de solución de hialuronidasa y 100 μ L de solución de ácido hialurónico. El ácido oleanólico (Sigma Aldrich CAS.508-02-1, USA) se utilizó como control positivo. Se realizaron tres experimentos independientes, repetidos por triplicado.

El solvente utilizado en las diluciones (etanol) fue utilizado como blanco, con el fin de corroborar que este no ejercía ningún tipo de inhibición sobre la enzima estudiada.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3.1. CONDICIONES DE CULTIVO QUE PERMITAN INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS Y DE METABOLITOS ANTIOXIDANTES

3.1.1. Selección de las cepas:

Los aislados de *G. hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5) se seleccionaron de un grupo de *actinobacterias* previamente estudiadas, donde se identificó su capacidad de producción de pigmentos (Figura 1) y metabolitos con la capacidad de secuestrar radicales libres DPPH (*G. hongkongensis* Z9.2D8: 52.86% y *G. hongkongensis* G11.1D5: 48.91%). Además, no presentaron citotoxicidad frente a las líneas de fibroblastos dérmicos humanos (línea HDFa). Conforme a lo descrito en la investigación previa de Sánchez-Suárez et al. en 2022, ambas cepas (Z9.2D8 y G11.1D5) fueron previamente identificadas como *Gordonia hongkongensis*, con una similitud del 100% mediante secuenciación del gen RNA ribosomal 16S. Estas secuencias se compararon con la base de datos de RNA utilizando el algoritmo megaBLAST (Morgulis et al., 2008). Las secuencias de consenso se depositaron en GenBank con los números de acceso OK598071 a OK598080. Para encontrar los vecinos más cercanos, que se utilizaron como secuencias de referencia en el análisis filogenético, se construyó un árbol Neighbor-Joining con MEGA versión X (Kumar et al., 2018), utilizando el modelo Tamura de 3 parámetros. La fiabilidad de la topología del árbol filogenético se evaluó mediante la prueba de bootstrap (1000 réplicas) (Sánchez-Suárez, Díaz, Melo-Bolivar, et al., 2022).

Ambas cepas se reactivaron en su medio de aislamiento (*G. hongkongensis* G11.1D5: GYM y *G. hongkongensis* Z9.2D8: Zobell) en estado sólido, lo que confirmó la producción de pigmento (Figura 1). Posteriormente, se cultivaron en el mismo medio en estado líquido durante 7 días a 30°C y 150 rpm. Durante este proceso, se mantuvo la producción de pigmento para ambas cepas de interés.

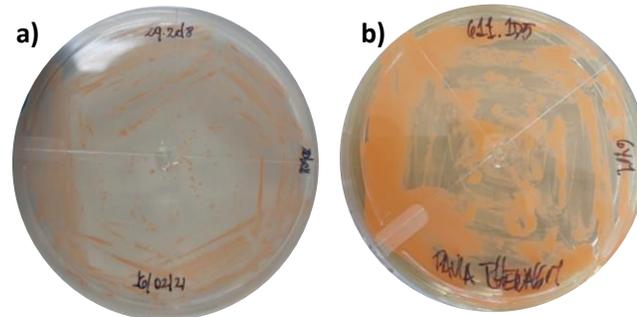


Figura 1. Crecimiento de cepas *G. hongkongensis* en su medio de aislamiento (a) *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio Zobell con agar b) *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM con agar, durante 7 días a 30°C.

A partir del extracto crudo de cada cepa, se realizó un barrido en el espectro UV-VIS, para determinar la longitud de onda a la cual se presenta un máximo de absorbancia para cada uno, como se muestra en la Figura 2. Se determinó que en el rango del espectro UV-Visible, la longitud con mayor absorbancia fue 474nm y 473nm, para *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5, respectivamente. La similitud entre los perfiles obtenidos en el espectro UV-Vis de los extractos elaborados a partir de la biomasa liofilizada de los cultivos de las cepas de *G. hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5) podrían indicar que los metabolitos presentes son similares en cuanto a compuestos cromóforos (Corrales Ramírez & Caycedo Lozano, 2020), lo cual llevaría a pensar en una posible similitud entre las sustancias producidas por las cepas estudiadas.

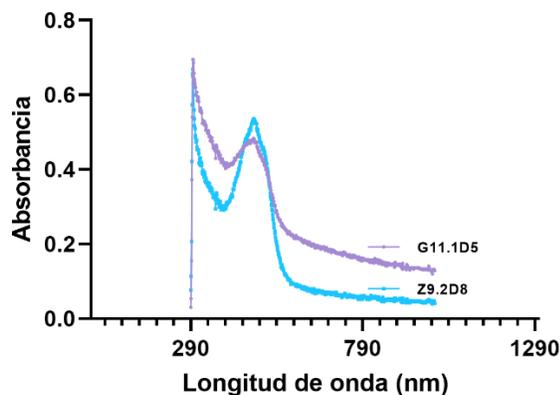


Figura 2. Barrido de longitud de onda de extractos etanólicos crudo obtenidos de biomasa liofilizada de *G. hongkongensis*. La cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 fue cultivada en medio Zobell y la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 en medio GYM. La línea de color azul representa el perfil para el extracto crudo, color naranja, obtenido en el espectro UV-Vis de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 y la línea morada representa el perfil para el extracto crudo, color naranja, obtenido en el espectro UV-Vis de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5. La absorbancia fue medida cada 1nm.

Las longitudes de onda encontradas presentan similitudes con la literatura, puesto que los extractos crudos de interés presentaban coloración naranja, la cual ha sido reportada con longitud de onda entre 440 y 500nm (Agilent, 2016). Además, Ye et al., 2019, estableció en su estudio que pigmentos carotenoides de color naranja como la fucoxantina presentan longitud de onda de absorción máxima de 447 nm. Por otro lado, Shatila et al. (2013) y Varsha & Aspara (2013) informaron que los carotenoides (color naranja) producidos a partir de *Planococcus maritimus* AHJ 2 absorben la luz en el visible a una longitud de onda de 466 nm. Así mismo, Sasidharan et al. (2013), Ramasamy y Udayasuriyan (2006) establecieron que la mayoría de los carotenoides de color naranja absorben la luz máxima a 467 nm, con un pico ancho (Jaber et al., 2022). Basándonos en estos estudios previos, es posible plantear la hipótesis de la presencia de carotenoides de color naranja, en los extractos crudos con actividad antioxidante, obtenidos a partir de la biomasa liofilizada de los cultivos de las cepas *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5.

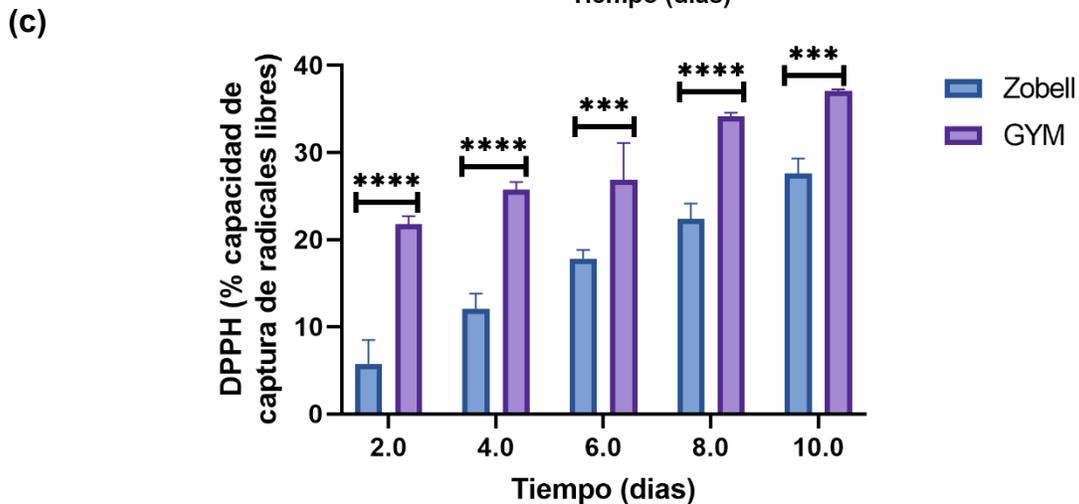
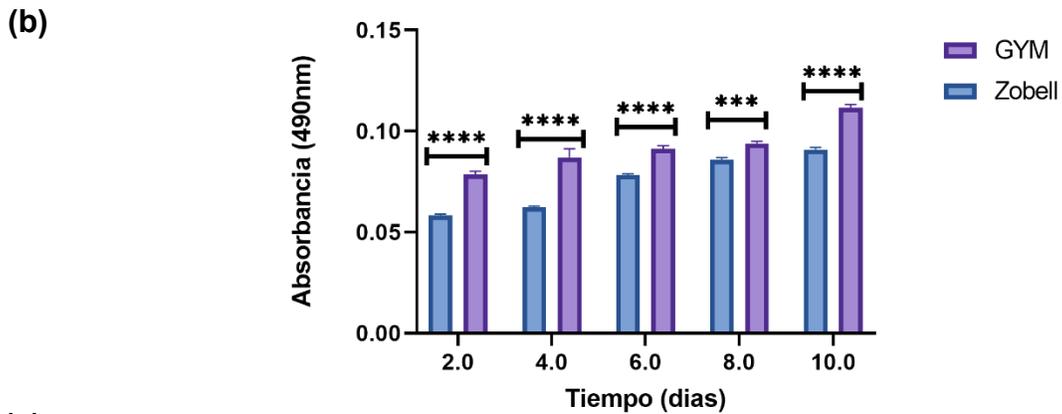
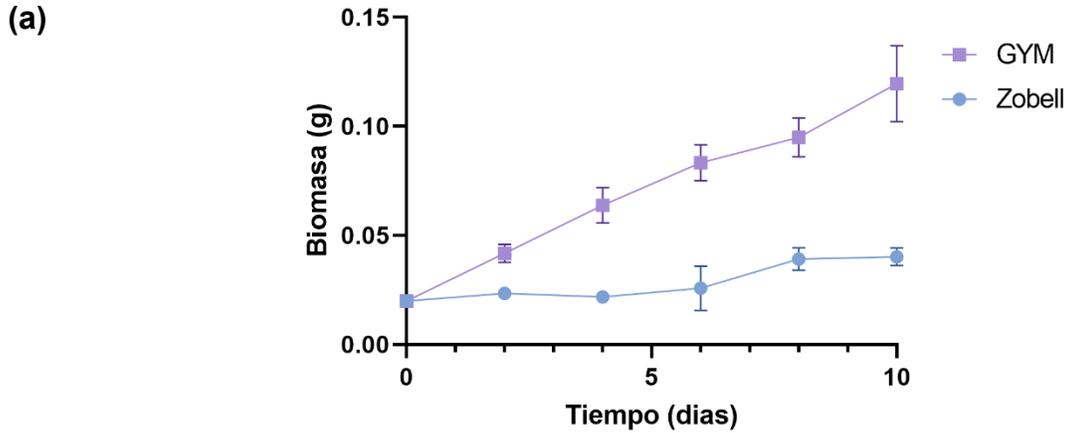
3.1.2. Selección del medio de cultivo:

La producción de pigmentos (Figura 3b y 4b) y metabolitos antioxidantes (Figura 3c-d y 4c-d) de las dos cepas de *G. hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5), fue evaluada en medio GYM y Zobell, durante diez días, como se muestra en las Figuras 3 y 4. Dado que se ha demostrado que el medio de cultivo tiene un efecto sobre la velocidad de crecimiento y la producción de metabolitos por parte de los microorganismos. Cabe resaltar que, para este caso, también se evaluó el efecto de los medios de cultivo GYM y Zobell, en la producción de biomasa (Figura 3a y 4a), con el objetivo de verificar la posible relación entre el crecimiento de la cepa y la producción de los metabolitos de interés (pigmentos y antioxidantes). Los medios de cultivo GYM y Zobell, se seleccionaron debido a su capacidad para soportar una serie de bacterias marinas (Devivilla et al., 2019), ya que contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento de bacterias heterótrofas como las *actinobacterias* (Wu et al., 2018). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media de los datos con su desviación estándar.

El comportamiento de ambas cepas en cuanto a la producción de pigmentos fue muy similar, presentando en ambos casos diferencias significativas empleando el medio GYM ($P < 0.0001$) en todos los tiempos de cultivo (Figura S2-S6). La capacidad antioxidante, medida mediante el ensayo de captura de radicales DPPH (Figura S3-S7) y ABTS (Figura S4-S8), también fue significativamente mayor en el medio GYM en ambas cepas, con valores de P inferiores a 0.0001 en todos los casos. Es importante destacar que la diferencia entre la capacidad de captura de radicales ABTS y DPPH se debe al hecho de que el ensayo de capacidad antioxidante de radicales DPPH es más adecuado para medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofóbica, mientras que el ensayo de capacidad antioxidante de radicales ABTS es apropiado para medir la bioactividad de compuestos tanto hidrofílicos como lipofílicos (Sarmiento-tovar et al., 2022). Esto puede permitir obtener valores más altos de capacidad antioxidante, ya que el rango de inhibición de especies reactivas de oxígeno (EROS) puede ser mucho mayor (Mendoza Isaza et al., 2020).

Adicionalmente, se observó que para ambas cepas de *G. hongkongensis*, se obtuvo una significativa mayor producción de biomasa en el medio GYM en comparación con Zobell ($P < 0.0001$). El uso de la prueba de Tukey reveló que, para la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8, la biomasa generada fue significativamente diferente utilizando el medio GYM a partir del día 2, como se muestra en la Figura S1. Mientras que la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5

mostró diferencias significativas en la producción de biomasa utilizando el medio GYM a partir del día 2, con un valor de P de 0.0407, tal como se muestra en la Figura S5. Lo información anterior, permite inferir que medio de cultivo tiene una influencia significativa en el aumento en la producción de metabolitos especializados y que, para este caso este aumento parece ser resultado del aumento en la biomasa, lo cual está en línea con lo planteado por Wink et al., 2017, quienes establecieron que la glucosa es una excelente fuente de carbono que promueve el crecimiento y la producción de biomasa en *actinobacterias*.



(d)

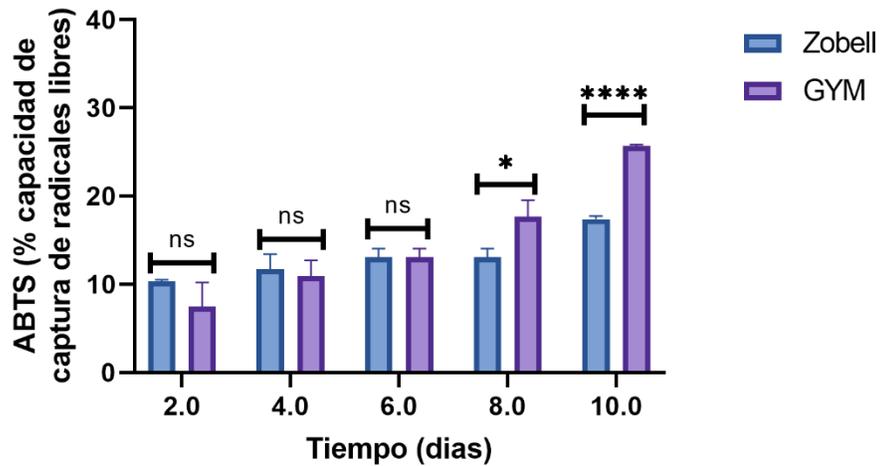
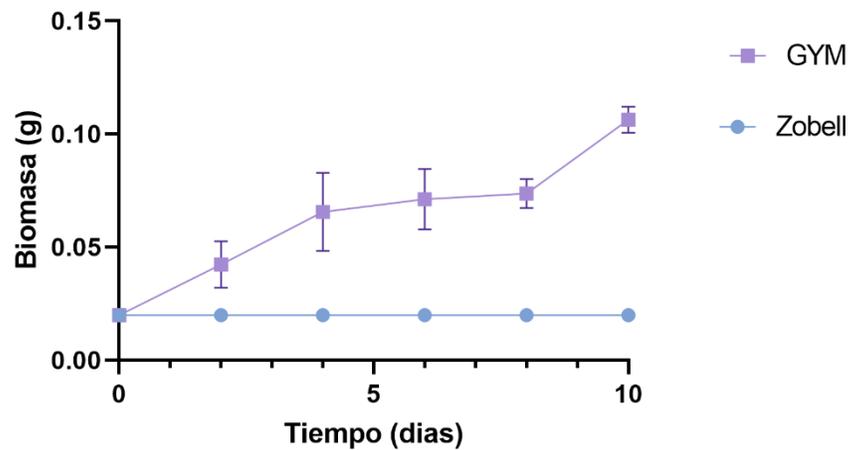
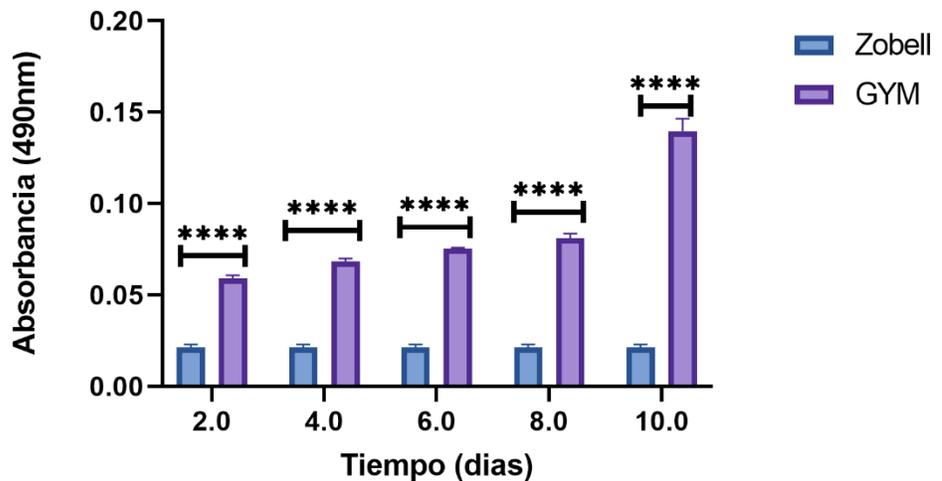


Figura 3. Efecto del medio de cultivo sobre (a) peso seco de la producción de biomasa (b) absorbancia del extracto etanólico crudo medida a 490 nm (c) Capacidad de captura de radicales DPPH medida a 515 nm (d) Capacidad de captura de radicales ABTS medida a 735 nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM y Zobell. Los puntos y las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar.

(a)



(b)



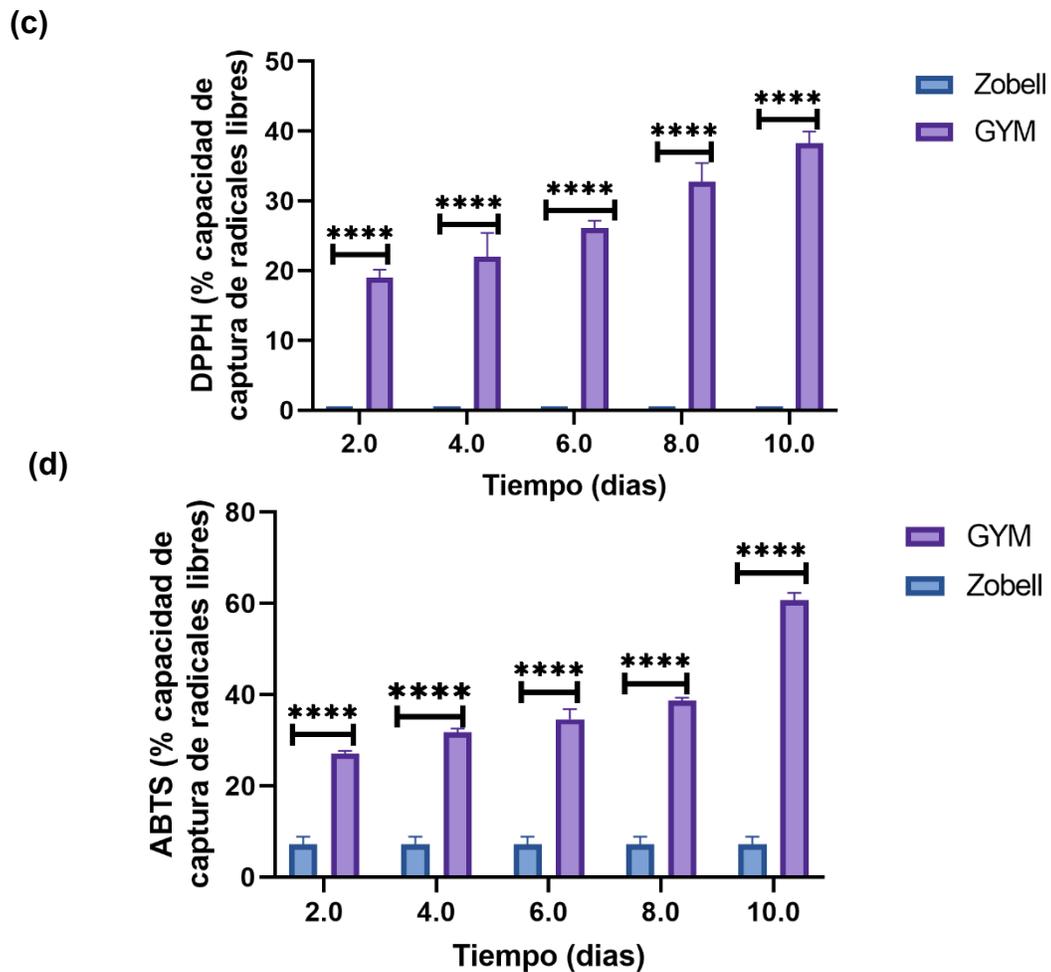


Figura 4. Efecto del medio de cultivo sobre (a) peso seco de la producción de biomasa (b) absorbancia del extracto etanólico crudo medida a 490 nm (c) Capacidad de captura de radicales DPPH medida a 515 nm (d) Capacidad de captura de radicales ABTS medida a 735nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM y Zobell. Los puntos y las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar.

El perfil de crecimiento de las cepas y los resultados de absorbancia y capacidad de secuestro de radicales DPPH y ABTS, a lo largo del tiempo, permite inferir que todas las variables respuesta presentaron mejores resultados en medio GYM que en medio Zobell, lo cual permite sugerir un aumento de pigmentos y compuestos antioxidantes, en el tiempo. De hecho, la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 no presentó crecimiento en medio Zobell, puesto que para todas las variables medidas, no hubo diferencias significativas en el tiempo. A partir de esto, se puede concluir que el metabolismo de los aislados es selectivo frente a la glucosa, como fuente específica de carbono, sobre la compleja mezcla de proteínas presente en el extracto de levadura, debido a que la glucosa es una fuente de carbono de fácil metabolismo que permite un crecimiento, desarrollo y producción más

rápida de metabolitos secundarios (Cruz-Bautista et al., 2022). La preferencia del género *Gordonia* por medios con fuentes de carbono específicas como la glucosa no es un comportamiento inusual. Alves & Paixão, 2014, encontraron que para el caso de la *Gordonia alkanivorans* cepa 1B, la combinación de D-glucosa y fructosa fueron las mejores fuentes de carbono para el crecimiento celular y la capacidad de desulfuración, que se ven afectados significativamente por la composición de nutrientes del medio de cultivo. además, la cepa 3612 de *Gordonia terrae*, aislada del suelo por Tsukamura, produjo colonias rugosas, de color rosa a naranja, sólo en medio con glucosa y agar extracto de levadura, lo que demuestra la preferencia del género estudiado por esta fuente de carbono (Takaichi et al., 2008).et al., 2008).

De los hallazgos anteriores, se puede concluir que la bioproducción de los metabolitos de interés está directamente relacionada con el medio de cultivo, que no necesariamente es el mismo que el medio de aislamiento, como en el caso de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8, que fue aislada en medio Zobell y posteriormente, en medio GYM mostró una mejora en la producción de biomasa, concentración de pigmento y capacidad antioxidante. El medio seleccionado para la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 continuó siendo GYM.

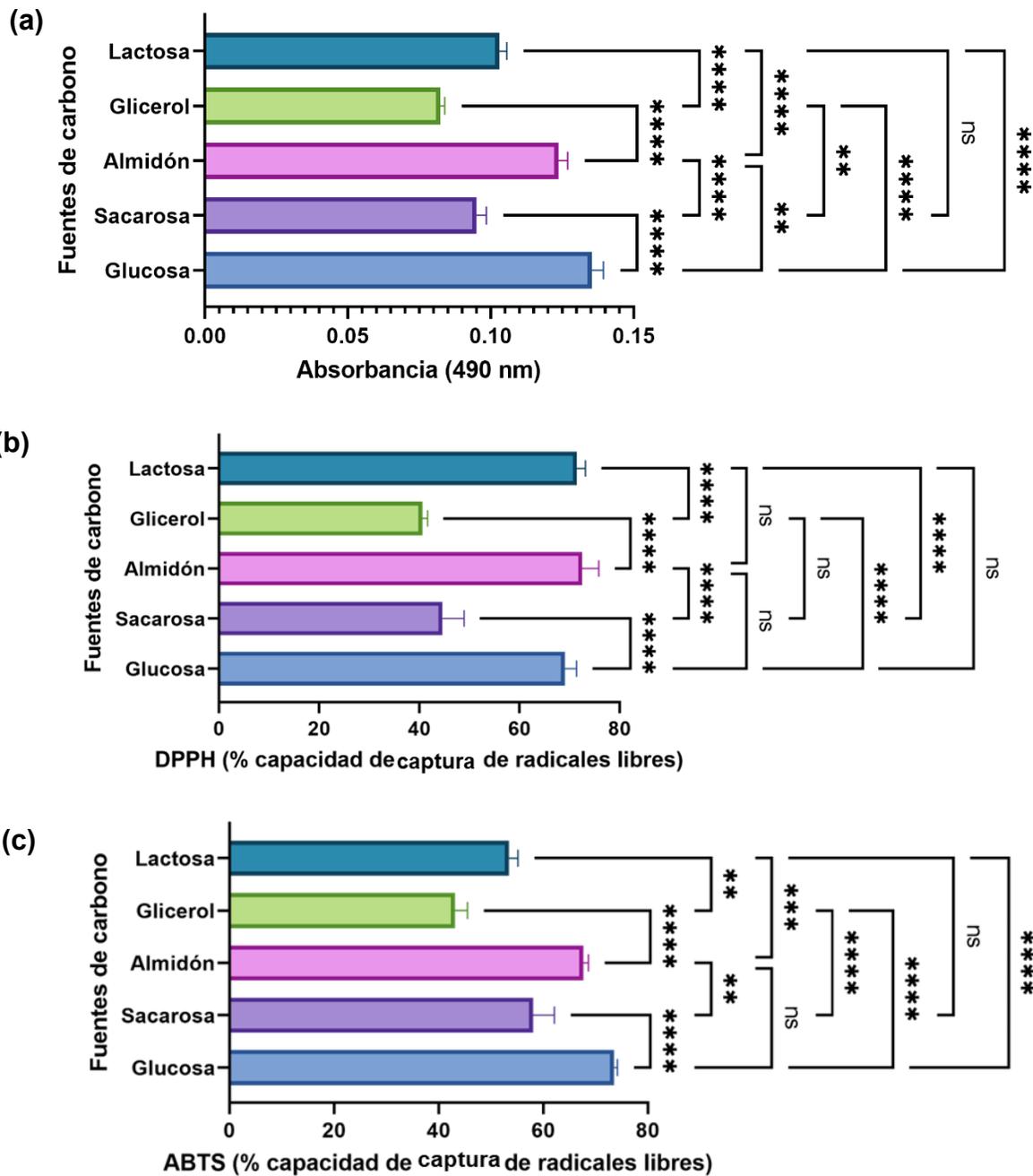
3.1.3. Efecto de la fuente de carbono:

Con el objetivo de mejorar la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes en las dos cepas de *G. hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5), se llevó a cabo una evaluación de varias fuentes de carbono en el medio de crecimiento (GYM). En este ensayo, se suministraron glucosa, sacarosa, almidón, glicerol y lactosa de forma individual a una concentración de 4 g/L. Es importante destacar que, para ambas cepas, la variación en las fuentes de carbono no mostró diferencias estadísticamente significativas en la producción de biomasa, según el análisis de varianza (ANOVA) con un valor P inferior a 0.0001. Sin embargo, se observó que el almidón y la sacarosa presentaron en una mayor producción de biomasa en comparación con las otras fuentes de carbono para las cepas *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5, respectivamente, según el análisis de Tukey. Esto sugiere que el crecimiento celular en bacterias y la producción de biomasa no siempre están directamente relacionados con la formación de metabolitos secundarios, y que el cambio en la fuente de carbono puede modificar el metabolismo de una cepa. Este comportamiento es similar a los resultados obtenidos en la fermentación de *Gordonia terrae* TWRH01, que mostró que la mayor concentración de biomasa producida por glucosa y fructosa no se reflejaba directamente en la producción de pigmentos (Loh et al., 2020). Por lo tanto, se puede inferir que en algunas cepas de *Gordonia* es común encontrar que la producción de biomasa y metabolitos secundarios no presentan una relación directa.

El análisis de varianza unidireccional (ANOVA) reveló que las fuentes de carbono tenían un efecto significativo en la producción de pigmento en ambas cepas ($P < 0.0001$). En el caso de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8, se observó que la glucosa producía la mayor absorbancia (0.14) en los extractos etanólicos crudos obtenidos a partir de cultivos bacterianos, seguida del almidón (0.12). Es relevante destacar que el test de Tukey no mostró diferencias significativas entre la glucosa y el almidón como fuentes de carbono ($P = 0.0067$) en la producción del pigmento de interés, como se muestra en la Figura 5. Por otro lado, la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 exhibió mejores valores de absorbancia para la sacarosa (0.10), la cual resultó significativamente superior en la producción de pigmento en comparación con las otras fuentes de carbono. Los valores P obtenidos mediante el test de Tukey fueron inferiores a 0.0043, como se muestra en la Figura 6. Es importante

mencionar que el valor de absorbancia más bajo fue producido por el glicerol, con absorbancias de 0.08 y 0.06 para las cepas *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5, respectivamente, como también se muestra en las Figuras 5 y 6. Esta fuente de carbono mostró tener un efecto significativamente menor en comparación con las demás, con un valor P inferior a 0.001 en todos los casos.

El rendimiento de extracción siguió un patrón similar al observado en la biomasa y en las variables de respuesta. En el caso de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8, se registró un rendimiento de extracción estadísticamente superior al utilizar almidón como fuente de carbono ($P=0.0001$). Por otro lado, para la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5, se observó un rendimiento de extracción más elevado al emplear sacarosa como fuente de carbono ($P=0.0001$), como se puede apreciar en las Figuras 5d y 6d.



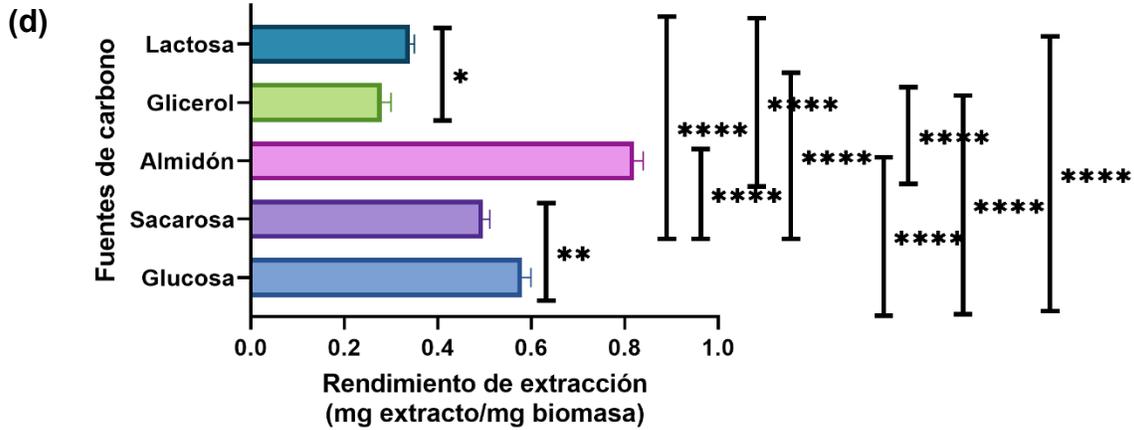
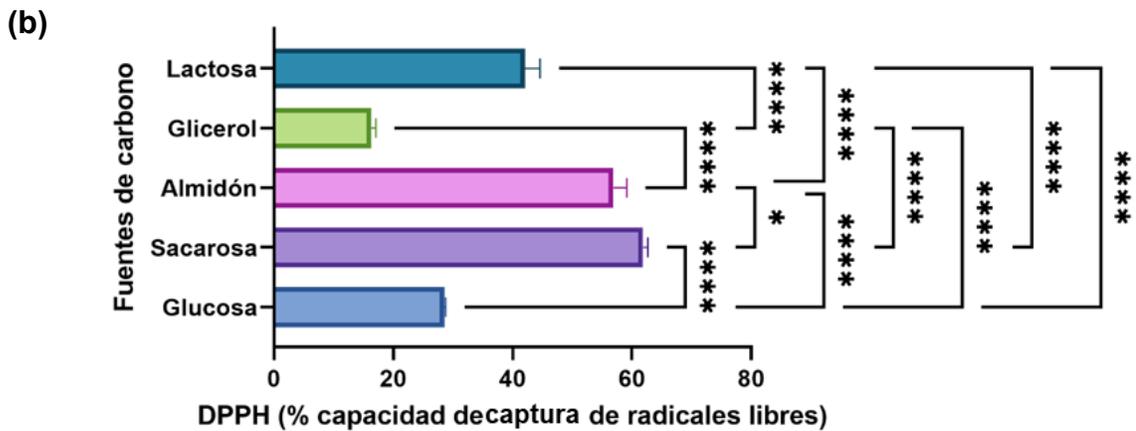
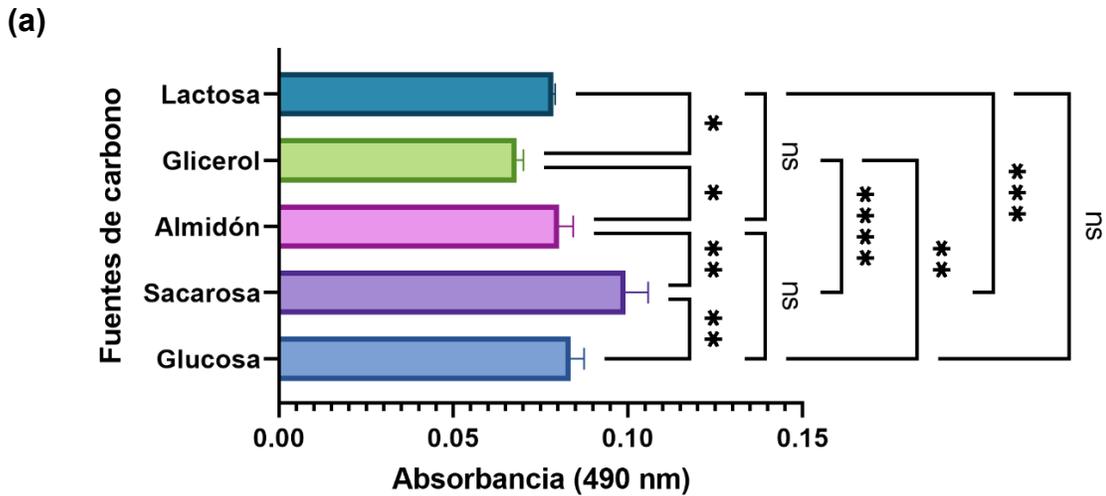
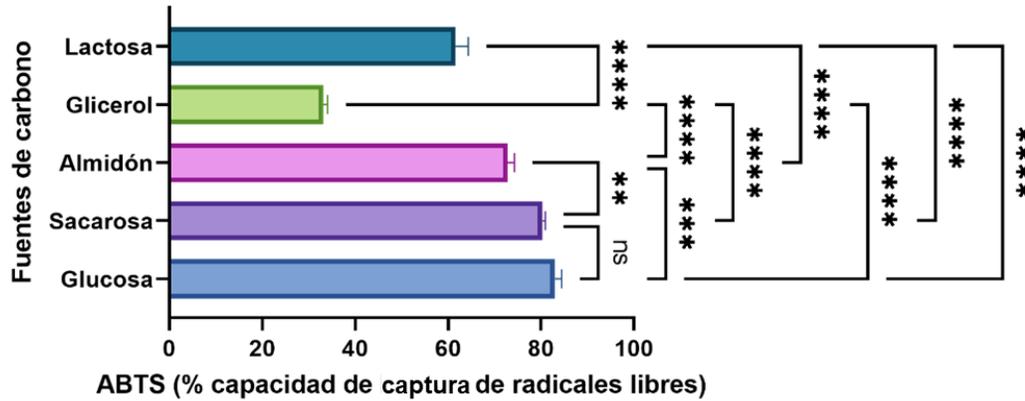


Figura 5. Comparación múltiple del efecto del medio de la fuente de carbono sobre (a) absorbancia del extracto etanólico crudo medida a 490 nm (b) Capacidad de captura de radicales DPPH medida a 515 nm (c) Capacidad de captura de radicales ABTS medida a 735nm (d) rendimiento de extracción etanólica. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivadas en medio GYM. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.



(c)



(d)

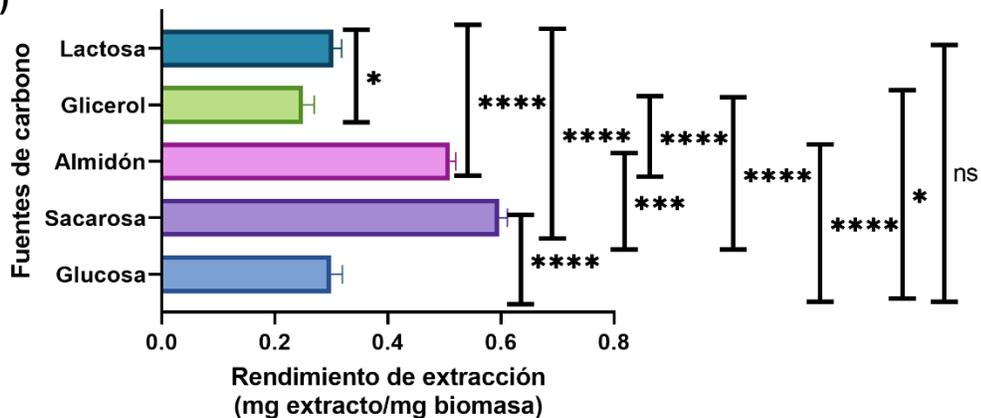


Figura 6. Efecto del medio de la fuente de carbono sobre (a) absorbancia del extracto etanólico crudo medida a 490 nm (b) Capacidad de captura de radicales DPPH medida a 515 nm (d) Capacidad de captura de radicales ABTS medida a 735nm (d) rendimiento de la extracción etanólica. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivadas en medio GYM. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

Se evaluó la capacidad antioxidante utilizando las metodologías de captura de radicales DPPH y ABTS en los extractos etanólicos crudos obtenidos de las fermentaciones de *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5, cultivados con diferentes fuentes de carbono. Ambos métodos revelaron diferencias significativas ($P < 0.0001$), resaltando la importancia de seleccionar la fuente de carbono adecuada para maximizar la capacidad antioxidante en ambas cepas.

En el caso de *G. hongkongensis* Z9.2D8, se observó que la glucosa producía el valor más alto de capacidad de captura DPPH (72.49%), seguida de la lactosa (71.46%) como fuentes

de carbono del medio de cultivo. Estas dos fuentes no mostraron diferencias significativas entre ellas, con un valor P de 0.9901 según el test de Tukey. Para la capacidad de captura de radicales ABTS, el medio de cultivo con glucosa (73.59%), seguido del medio con almidón (67.69%), mostraron los resultados más altos (Figura 5c-d), también sin diferencias significativas ($P = 0.0634$), como se muestra en las Figuras 5c-d y 6c-d. Por otro lado, el glicerol arrojó el valor significativamente más bajo (DPPH: 40.60%, ABTS: 43.12%), con P inferior a 0.0001 en ambos casos.

Para la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5, se encontraron valores significativamente más altos con sacarosa como fuente de carbono (61.89%) en la capacidad de captura de radicales DPPH. En cuanto a la capacidad de captura de radicales ABTS, los extractos de los medios con glucosa (83%) y sacarosa (80.33%) mostraron los mejores resultados. Estos tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos ($P = 0.3244$), como se muestra en las figuras 5c-d y 6c-d.

Es importante destacar que la capacidad de secuestro de radicales ABTS y DPPH puede variar significativamente, ya que se dirigen a la inhibición de dos tipos diferentes de radicales libres. Esto sugiere que el extracto crudo obtenido en medio con glucosa favoreció la producción de sustancias capaces de inhibir una mayor cantidad de radicales libres DPPH, mientras que el extracto crudo producido con almidón, como fuente de carbono, permitió obtener una mayor concentración de sustancias capaces de inhibir mayores cantidades de radicales ABTS en el caso de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8. Para la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5, los extractos producidos en medio con sacarosa promovieron la inhibición de los radicales DPPH, y esta fuente de carbono, al igual que la glucosa, generaron una mayor inhibición de los radicales ABTS.

Teniendo en cuenta que el peso de cada variable de respuesta es del 50%, los resultados anteriores llevaron a la selección de almidón y sacarosa como fuentes de carbono para las cepas *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5, respectivamente. La diferencia en los valores de absorbancia y capacidad antioxidante con la variación de la fuente de carbono respalda la idea de que la formación de metabolitos secundarios en *actinobacterias* no solo está regulada por la naturaleza de la fuente de carbono, sino también por el tipo de fuente de carbono (Wink et al., 2017). Además, varios estudios han informado que el glicerol se considera una fuente de carbono pobre en energía y no suele ser metabolizado por las diferentes especies de *Gordonia*, por lo que no contribuye significativamente a la producción de metabolitos secundarios como los pigmentos (Loh et al., 2020). Otros estudios también han destacado que las fuentes de carbono más utilizadas industrialmente en *actinobacterias* para la producción de metabolitos especializados, como pigmentos y antioxidantes, son los polisacáridos (como el almidón), los disacáridos (como la sacarosa) y oligosacáridos (como la lactosa) debido a la capacidad de las *actinobacterias* para hidrolizar estos compuestos (Vasanthabharathi et al., 2011). Es importante destacar que algunos autores, como Dagstager et al. (2006), han encontrado que la mejor fuente de carbono para aumentar la producción de pigmentos con actividad antioxidante a partir de actinobacterias es el almidón. Además, investigadores como Barczynska et al., (2015) han sostenido que en presencia de almidón como fuente de carbono, las *actinobacterias* muestran un aumento en la producción de biomasa, lo que respalda los resultados obtenidos en el presente estudio (Musleh et al., 2016).

Adicionalmente, es relevante mencionar que la glucosa, como fuente de carbono de rápida asimilación, generalmente contribuye a la producción de metabolitos primarios y crea una

represión catabólica del carbono en la producción de metabolitos secundarios específicos. Esto significa que la producción de metabolitos secundarios suele comenzar cuando se agota la glucosa y el crecimiento de la cepa disminuye (Wink et al., 2017). Por esta razón, fueron seleccionados el almidón y la sacarosa, como fuentes de carbono para el medio de cultivo de las cepas *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5, respectivamente. Estas elecciones están respaldadas por el hecho de que estas fuentes de carbono promovieron tanto un aumento en la producción de pigmento como una mayor capacidad antioxidante en las cepas estudiadas.

3.1.4. Efecto de la fuente de nitrógeno:

Las fuentes de nitrógeno son nutrientes esenciales para el crecimiento celular y la biosíntesis de proteínas en todos los organismos. En este estudio, se emplearon tanto fuentes de nitrógeno orgánicas (extracto de malta, extracto de levadura, úrea, caseína y peptona) como inorgánicas (sulfato de amonio) para investigar los efectos de diferentes fuentes de nitrógeno en la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. Se incorporaron 14 g/L de cada una de estas fuentes de nitrógeno al medio GYM, reemplazando los componentes iniciales de extracto de malta y extracto de levadura. Se utilizó almidón y sacarosa para cepas *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5, respectivamente, como principales fuentes de carbono.

El crecimiento y la producción de pigmentos de ambas cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5) variaron dependiendo de la fuente de nitrógeno utilizada, y solo se observó crecimiento y producción de pigmentos cuando se emplearon las fuentes de nitrógeno originales del medio GYM, es decir, el extracto de malta y el extracto de levadura. Los cultivos que no presentaron crecimiento y producción de pigmento, no fueron analizados, como se planteó metodología descrita previamente.

La fermentación de *Gordonias* con fuentes de nitrógeno orgánico, como el extracto de levadura, ha demostrado consistentemente un aumento en la producción de metabolitos secundarios, como pigmentos (Loh et al., 2020). Se ha postulado que esta tendencia puede relacionarse con la riqueza de vitaminas, especialmente del complejo B, y aminoácidos presentes en el extracto de levadura, lo que potencia la biosíntesis de compuestos de interés (Hakobyan et al., 2012). Por otro lado, el uso de fuentes orgánicas complejas como el extracto de malta también ha ganado popularidad debido a su capacidad para estimular el crecimiento de *actinobacterias*, sin restringir el uso de otras fuentes de nitrógeno (Wink et al., 2017). Esto se debe, a la presencia de una amplia gama de nutrientes en el extracto de malta, incluyendo una mayor concentración de azúcares, proteínas y minerales en comparación con otras fuentes de nitrógeno (Seixas Chaves, 2019). La importancia de estos nutrientes se destaca, ya que las *actinobacterias* requieren un suministro adecuado de nitrógeno para el crecimiento celular, la síntesis de biomasa y la producción de una diversidad de metabolitos secundarios derivados de aminoácidos clave (Wink et al., 2017).

3.1.5. Evaluación de las variables que afectan a los pigmentos y metabolitos antioxidantes mediante el diseño Plackett-Burman:

La metodología de Plackett-Burman es una herramienta útil para la identificación de factores significativos que pueden influir en la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. En el presente estudio, se evaluaron ocho variables independientes diferentes, incluyendo la concentración de inóculo, la concentración de fuente de carbono

y nitrógeno, la concentración de NaCl, el pH, el tiempo de incubación, la temperatura y la velocidad de agitación. Estas variables se analizaron en una matriz de Plackett-Burman con 16 corridas, y cada corrida se realizó por triplicado.

Los valores obtenidos para cada combinación de condiciones se registraron en las Tablas 1 y 2, para las cepas *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5, respectivamente. Este enfoque experimental permitió identificar cuáles de estas variables independientes tienen un impacto significativo en la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes.

Tabla 1. Diseño experimental de Plackett-Burman usado para la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. La absorbancia de los extractos etanólicos crudos fue medida a 490 nm, la capacidad de captura de radicales DPPH fue medida a 515 nm, la capacidad de captura de radicales ABTS fue medida a 735nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Corrida	A	B	C	D	E	F	G	H	DPPH (%)	Absorbancia (490 nm)	ABTS (%)
1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	3.98	0,15	28,89
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	32.10	0,31	53,15
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	21.79	0,06	23,88
4	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	62.93	0.17	46.71
5	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	53.15	0.05	34.43
6	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	6.92	0.05	46.79
7	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	47.97	0.06	34.44
8	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	3.56	0.13	22.72
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	45.71	0.06	35.88
10	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1.43	0.07	31.45
11	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	42.64	0.06	29.76
12	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	3.35	0.06	18.50
13	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	18.36	0.08	40.44
14	1	1	1	1	1	1	1	1	49.08	0.14	34.29
15	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	58.86	0.16	49.00
16	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	64.00	0.11	41.77
17	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	2.8	0.14	26.78
18	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	34.87	0.20	53.29
19	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	18.71	0.06	26.02
20	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	74.42	0.16	50.55
21	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	48.29	0.07	33.20
22	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	4.95	0.05	49.54
23	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	47.14	0.06	35.73
24	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	3.56	0.11	23.77
25	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	64.64	0.06	34.23

Corrida	A	B	C	D	E	F	G	H	DPPH (%)	Absorbancia (490 nm)	ABTS (%)
26	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1.65	0.08	30.85
27	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	31.48	0.06	29.62
28	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	5.47	0.06	18.50
29	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	19.07	0.10	38.15
30	1	1	1	1	1	1	1	1	39.62	0.15	34.98
31	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	61.11	0.11	46.86
32	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	69.74	0.11	44.24
33	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	2.50	0.15	28.29
34	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	43.16	0.29	53.84
35	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	19.78	0.06	28.16
36	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	73.99	0.17	54.39
37	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	46.45	0.08	31.41
38	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1.53	0.05	50.23
39	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	43.35	0.12	35.16
40	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	8.24	0.10	25.28
41	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	65.91	0.07	33.14
42	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	3.8	0.12	30.85
43	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	30.30	0.04	29.62
44	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	7.81	0.05	18.35
45	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	18.95	0.09	39.15
46	1	1	1	1	1	1	1	1	34.37	0.14	36.77
47	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	59.81	0.13	50.00
48	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	61.23	0.09	43.28
	Niveles										
-1	0.5	2	7	20	6.5	7	20	80			
1	1	6	14	40	7.5	14	30	180			

A: Concentración de inóculo (g/L)
 B: Concentración de fuente de carbono (g/L)
 C: Concentración de fuente de nitrógeno (g/L)
 D: Concentración de NaCl (g/L)
 E: pH
 F: Tiempo de incubación (días)
 G: Temperatura (°C)
 H: Velocidad de agitación (rpm)
 %: Porcentaje de captura de radicales libres

Tabla 2. Diseño experimental de Plackett-Burman usado para la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. La absorbancia de los extractos etanólicos crudos fue medida a 490 nm, la capacidad de captura de radicales DPPH fue medida a 515 nm, la capacidad de

captura de radicales ABTS fue medida a 735 nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Corrida	A	B	C	D	E	F	G	H	DPPH (%)	ABSORBANCIA (490 nm)	ABTS (%)
1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	40.13	0.02	31.60
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	52.30	0.17	66.59
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	10.54	0.10	12.61
4	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	24.24	0.35	82.90
5	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	20.71	0.07	27.84
6	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	66.42	0.24	47.89
7	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	45.01	0.07	35.01
8	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	15.04	0.08	26.48
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	65.27	0.15	58.78
10	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	9.73	0.06	25.88
11	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	63.00	0.14	39.79
12	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	11.64	0.06	26.78
13	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	13.86	0.08	22.31
14	1	1	1	1	1	1	1	1	41.20	0.34	39.38
15	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	25.58	0.15	23.88
16	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	23.39	0.23	73.03
17	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	34.18	0.02	29.19
18	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	52.72	0.19	68.78
19	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	13.38	0.12	12.61
20	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	25.50	0.31	80.30
21	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	24.78	0.08	29.90
22	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	70.49	0.26	47.89
23	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	40.62	0.08	36.16
24	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	12.06	0.12	25.73
25	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	68.25	0.11	57.68
26	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	8.02	0.06	26.33
27	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	69.18	0.11	44.73
28	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	10.36	0.08	26.93
29	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	13.26	0.12	21.03
30	1	1	1	1	1	1	1	1	35.55	0.30	41.16
31	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	34.82	0.19	25.45
32	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	27.85	0.28	73.31
33	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	38.64	0.02	32.66
34	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	56.34	0.18	65.90
35	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	12.79	0.14	13.46
36	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	24.88	0.35	79.75

Corrida	A	B	C	D	E	F	G	H	DPPH (%)	ABSORBANCIA (490 nm)	ABTS (%)
37	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	28.20	0.07	30.59
38	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	64.84	0.28	48.72
39	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	37.66	0.10	33.87
40	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	19.29	0.08	26.78
41	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	59.11	0.14	57.68
42	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	11.00	0.07	28.59
43	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	67.86	0.09	43.22
44	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	14.19	0.08	26.18
45	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	11.37	0.13	24.17
46	1	1	1	1	1	1	1	1	35.42	0.30	41.14
47	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	30.44	0.15	26.59
48	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	33.17	0.24	74.70
Niveles											
-1	0.5	2	7	20	6.5	7	20	80			
1	1	6	14	40	7.5	14	30	180			

A: Concentración de inóculo (g/L)
 B: Concentración de fuente de carbono (g/L)
 C: Concentración de fuente de nitrógeno (g/L)
 D: Concentración de NaCl (g/L)
 E: pH
 F: Tiempo de incubación (días)
 G: Temperatura (°C)
 H: Velocidad de agitación (rpm)
 %: porcentaje de captura de radicales libres

3.1.5.1. Absorbancia del extracto crudo:

La producción más destacada de extracto crudo de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8, medida en términos de absorbancia (0.31), se alcanzó en la corrida No. 2. En esta corrida, las condiciones fueron las siguientes: concentración de inóculo (1 g/L), concentración de almidón (6 g/L), concentración de extracto de malta (5 g/L), concentración de extracto de levadura (2 g/L), concentración de NaCl (30 g/L), pH de 7.5, tiempo de incubación de 7 días, temperatura de 20 °C y velocidad de agitación de 180 rpm. En contraste, el valor más bajo de absorbancia (0.04) se obtuvo en la corrida No. 43, con las siguientes condiciones: concentración de inóculo (0.5 g/L), concentración de almidón (2 g/L), concentración de extracto de malta (10 g/L), concentración de extracto de levadura (4 g/L), concentración de NaCl (30 g/L), pH de 6.5, tiempo de incubación de 7 días, temperatura de 30 °C y velocidad de agitación de 180 rpm.

El análisis estadístico ANOVA de la absorbancia (consulte la Tabla S3) nos permite inferir, con un nivel de confianza del 95%, qué variables son estadísticamente significativas para la producción de pigmentos, en términos de absorbancia, cuando el valor p es inferior a 0.05. Estas variables incluyen la concentración de inóculo, la concentración de la fuente de carbono, el tiempo de incubación, la temperatura y la velocidad de agitación.

Esta conclusión se respalda adicionalmente mediante el diagrama de Pareto (véase la Figura 7), el cual muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados desde el efecto de mayor magnitud hasta el de menor magnitud, con una línea de referencia. Cualquier valor de efecto absoluto que supere esta línea de referencia se considera altamente relevante. La ubicación de esta línea depende del nivel de significación utilizado.

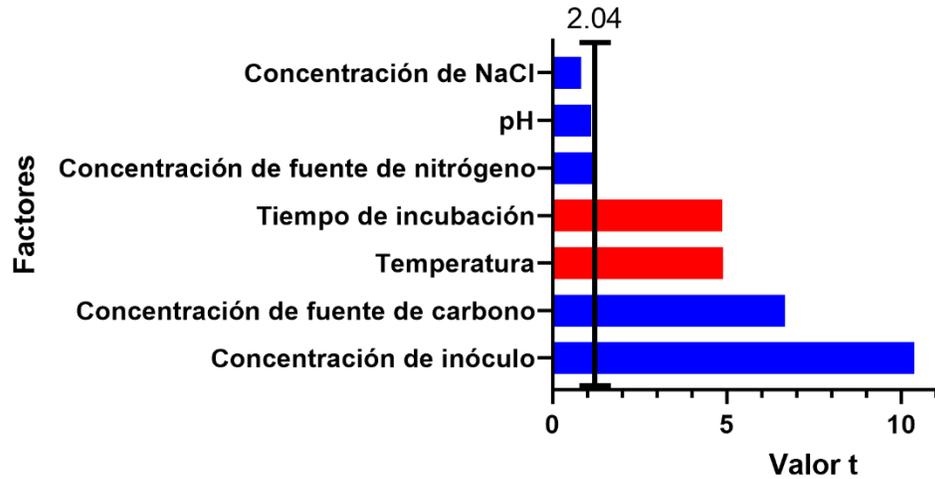


Figura 7. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de los factores implicados en la absorbancia de los extractos etanólicos crudos medida a 490nm. *G. hongkongensis* Z9. 2D8 cultivada en medio GYM. Los factores se analizaron mediante un diseño de Plackett Burman. Las barras representan el valor t de tres ensayos independientes. El color rojo representa los factores que presentan efecto negativo y el color azul los de efecto positivo en la absorbancia de los extractos crudos.

La absorbancia del extracto crudo producido se representó mediante una ecuación polinómica de primer orden (8), para la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8:

$$\text{Absorbancia extracto crudo (G. hongkongensis Z9.2D8)} = 0.105 + 0.032 A + 0.02 B + 0.004 C + 0.003 E - 0.015 F - 0.015 G + 0.009 H \quad (8)$$

El modelo (9) $R^2 = 90.74\%$ indica que la mayor parte de la variabilidad de la respuesta puede atribuirse a las variables independientes, y que solo el 9.26% de las variaciones totales no se explican por las variables independientes. El valor del coeficiente de determinación ajustado (Adjusted $R^2=86.40\%$) indica la alta significación del modelo.

Por otro lado, la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 exhibió el nivel más alto de absorbancia (0.35) en las corridas No. 4 y 36. En estas corridas, las condiciones fueron las siguientes: concentración de inóculo (1 g/L), concentración de fuente de sacarosa (2 g/L), concentración de extracto de malta (10 g/L), concentración de extracto de levadura (4 g/L), concentración de NaCl (20 g/L), pH de 7.5, tiempo de incubación de 7 días, temperatura de 20°C y velocidad de agitación de 180 rpm. En contraste, el valor más bajo de absorbancia (0.02) se obtuvo en las corridas No. 1, 17 y 33, con las siguientes condiciones: concentración de inóculo (1 g/L), concentración de fuente de carbono (6 g/L), concentración de extracto de malta (10 g/L), concentración de extracto de levadura (4 g/L), concentración de NaCl (20 g/L), pH de 6.5, tiempo de incubación de 7 días, temperatura de 30°C y velocidad de agitación de 180 rpm.

El análisis estadístico ANOVA (consulte la Tabla S4) de la absorbancia nos permite inferir, con un nivel de confianza del 95%, qué variables son estadísticamente significativas para la producción de pigmentos en términos de absorbancia, cuando el valor p es inferior a 0.05. Estas variables incluyen la concentración de inóculo, la concentración de fuente de nitrógeno, la concentración de NaCl, el pH, el tiempo de incubación y la velocidad de agitación.

Esta información se respalda adicionalmente mediante el diagrama de Pareto (consulte la Figura 8), que muestra el orden de las variables significativas y los factores no significativos, junto con una línea de referencia. Cualquier valor de efecto absoluto que supere esta línea de referencia se considera altamente esencial

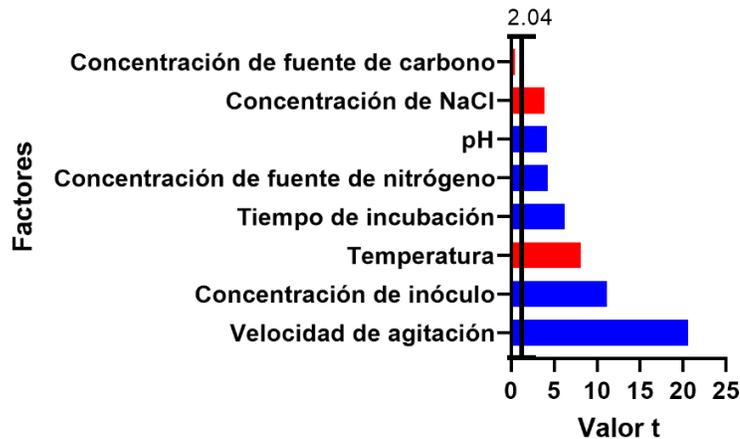


Figura 8. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de los factores implicados en la absorbancia de los extractos etanólicos crudos medida a 490nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los factores se analizaron mediante un diseño de Plackett Burman. Las barras representan el valor t de tres ensayos independientes. El color rojo representa los factores que presentan efecto negativo y el color azul los de efecto positivo en la absorbancia de los extractos crudos.

La absorbancia del extracto crudo producido se representó mediante una ecuación polinómica de primer orden (9), para la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5:

$$\text{Absorbancia extracto crudo (G. hongkongensis G11.1D5)} = 0.149 + 0.032 A - 0.001 B + 0.012 C - 0.011 D + 0.012 E + 0.018 F - 0.023 G + 0.059 H \quad (9)$$

El modelo (9) $R^2 = 96.92\%$ indica que la mayor parte de la variabilidad de la respuesta puede atribuirse a las variables independientes y que sólo el 4.08% de las variaciones totales no se explican por las variables independientes. El valor del coeficiente de determinación ajustado (Adjust $R^2=95.47\%$) indica la alta significación del modelo.

3.1.5.2. Actividad de captura de radicales DPPH:

La cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 alcanzó la mayor actividad de captura de radicales DPPH (74.42%) en el ensayo No. 20 (concentración de inóculo (1 g/L); Concentración de almidón (2 g/L); Concentración de extracto de malta (10 g/L); Concentración de extracto de

levadura (4 g/L); Concentración de NaCl (20 g/L); pH: 7.5; tiempo de incubación (7 días de incubación); temperatura (20°C); velocidad de agitación (180 rpm)) y el valor más bajo (1.43%) se obtuvo en la corrida No. 10 (Concentración de inóculo (0.5 g/L); Concentración de fuente de carbono (2 g/L); Concentración de extracto de malta (10 g/L); Concentración de extracto de levadura (4 g/L); Concentración de NaCl (20 g/L); pH: 7.5; tiempo de incubación (14 días de incubación); temperatura (30°C); velocidad de agitación (80 rpm)). El análisis estadístico ANOVA (Tabla S5) de la capacidad antioxidante permite inferir, con un nivel de confianza del 95%, qué variables son estadísticamente significativas sobre la citada bioactividad (concentración de la fuente de carbono, concentración de la fuente de nitrógeno, concentración de NaCl, pH, tiempo de incubación, temperatura y velocidad de agitación). Esta información se ve corroborada por el diagrama de Pareto (Figura 9), que muestra el orden de significación y las variables no significativas (concentración de inóculo).

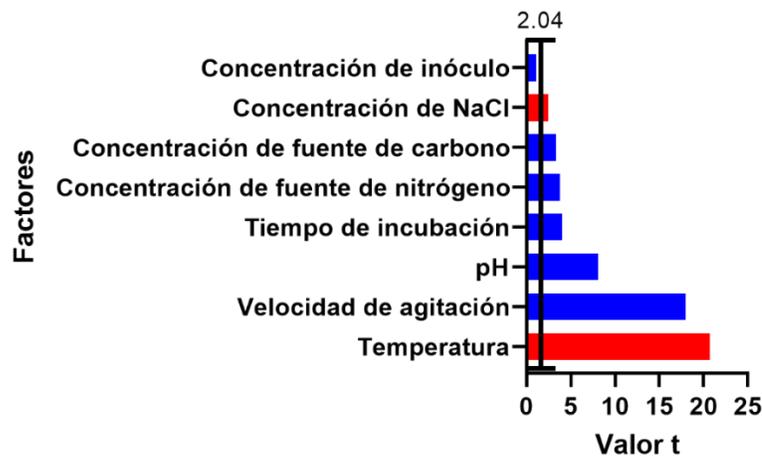


Figura 9. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de los factores implicados en la capacidad de captura de radicales DPPH de los extractos etanólicos crudos medida a 515nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los factores se analizaron mediante un diseño de Plackett Burman. Las barras representan el valor t de tres ensayos independientes. El color rojo representa los factores que presentan efecto negativo y el color azul los de efecto positivo en la absorbancia de los extractos crudos.

La capacidad de captura de radicales DPPH del extracto crudo producido se representó mediante una ecuación polinómica de primer orden (10), para la cepa Z9.2D8:

$$DPPH \text{ } G. \text{ hongkongensis } Z9.2D8 (\% \text{ capacidad captura radicales libres}) = 32.588 + 0.758 A + 2.314 B + 2.598 C - 1.725 D + 5.627 E + 2.814 F + 12.474 G - 0.513 H \quad (10)$$

El modelo (11) $R^2 = 98.26\%$ indica que la mayor parte de la variabilidad de la respuesta puede atribuirse a las variables independientes y que sólo el 1.74% de las variaciones totales no se explican por las variables independientes. El valor del coeficiente de determinación ajustado ($Adjust R^2 = 97.44\%$) indica la alta significación del modelo.

La mayor capacidad de captura de radicales DPPH (70.49%) de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 se encontró en el ensayo No. 22 (concentración de inóculo (1 g/L); 1; Concentración de sacarosa (2 g/L); Concentración de extracto de malta (5 g/L);

Concentración de extracto de levadura (2 g/L); Concentración de NaCl (20 g/L); pH: 6.5; tiempo de incubación (14 días de incubación); temperatura (30 °C); velocidad de agitación (180 rpm)) y el valor más bajo (8.02%) se obtuvo en la corrida No. 26 (Concentración de inóculo (0.5 g/L); Concentración de sacarosa (2 g/L); Concentración de extracto de malta (10 g/L); Concentración de extracto de levadura (4 g/L); Concentración de NaCl (20 g/L); pH: 7.5; tiempo de incubación (14 días de incubación); temperatura (30°C); velocidad de agitación (80 rpm). El análisis estadístico ANOVA (Tabla S6) de la actividad antioxidante permite inferir, con un nivel de confianza del 95%, qué variables son estadísticamente significativas para la capacidad de captura de radicales DPPH (concentración del inóculo, concentración de la fuente de carbono, concentración de la fuente de nitrógeno, concentración de NaCl, pH, tiempo de incubación y velocidad de agitación). Esta información se ve corroborada por el diagrama de Pareto (Figura 10), que muestra el orden de significación y las variables no significativas (temperatura).

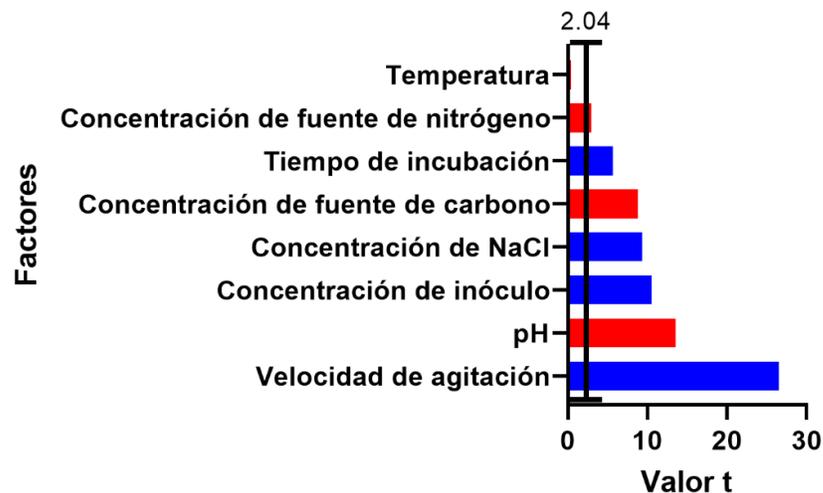


Figura 10. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de los factores implicados en la capacidad de captura de radicales DPPH de los extractos etanólicos crudos medida a 515nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los factores se analizaron mediante un diseño de Plackett Burman. Las barras representan el valor t de tres ensayos independientes. El color rojo representa los factores que presentan efecto negativo y el color azul los de efecto positivo en la absorbancia de los extractos crudos.

La capacidad de captura de radicales DPPH del extracto crudo producido se representó mediante una ecuación polinómica de primer orden (11), para la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5:

$$DPPH \text{ } G. \text{ hongkongensis } G11.1D5 \text{ (\% capacidad de captura de radicales libres)} = 33.631 + 4.843 A - 4.044 B - 1.351 C + 4.310 D - 6.232 E + 2.620 F + 0.200 G + 12.230 H \quad (11)$$

El modelo (12) $R^2 = 98.26\%$ indica que la mayor parte de la variabilidad de la respuesta puede atribuirse a las variables independientes y que sólo el 1.74% de las variaciones totales no se explican por las variables independientes. El valor del coeficiente de determinación ajustado (Adjust $R^2=97.44\%$) indica la alta significación del modelo.

3.1.5.3. Actividad de captura de radicales ABTS:

La cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 exhibió su máxima actividad de secuestro de radicales ABTS, alcanzando un destacable 54.39%, en el ensayo No. 36. En esta corrida, las condiciones experimentales incluyeron una concentración de inóculo de 1 g/L, una concentración de almidón de 2 g/L, una concentración de extracto de malta de 10 g/L, una concentración de extracto de levadura de 4 g/L, una concentración de NaCl de 20 g/L, un pH de 7.5, un tiempo de incubación de 7 días, una temperatura de 20°C y una velocidad de agitación de 180 rpm. Por otro lado, se obtuvo el valor más bajo de actividad de captura de radicales ABTS, que fue del 18.35%, en la corrida No. 44, con las siguientes condiciones: concentración de inóculo de 0.5 g/L, concentración de almidón de 6 g/L, concentración de extracto de malta de 5 g/L, concentración de extracto de levadura de 2 g/L, concentración de NaCl de 30 g/L, pH de 6.5, tiempo de incubación de 14 días, temperatura de 30°C y velocidad de agitación de 80 rpm.

El análisis estadístico ANOVA (consulte la Tabla S7) de la capacidad de captura de radicales ABTS nos permite inferir, con un nivel de confianza del 95%, qué variables ejercen una influencia estadísticamente significativa cuando el valor p es inferior a 0.05. Estas variables incluyen la concentración de inóculo, la concentración de la fuente de carbono, la concentración de NaCl, el pH, el tiempo de incubación, la temperatura y la velocidad de agitación. Este hallazgo se respalda con el diagrama de Pareto (véase la Figura 11), el cual presenta el orden de significancia de las variables y destaca las variables no significativas, como la concentración de la fuente de nitrógeno

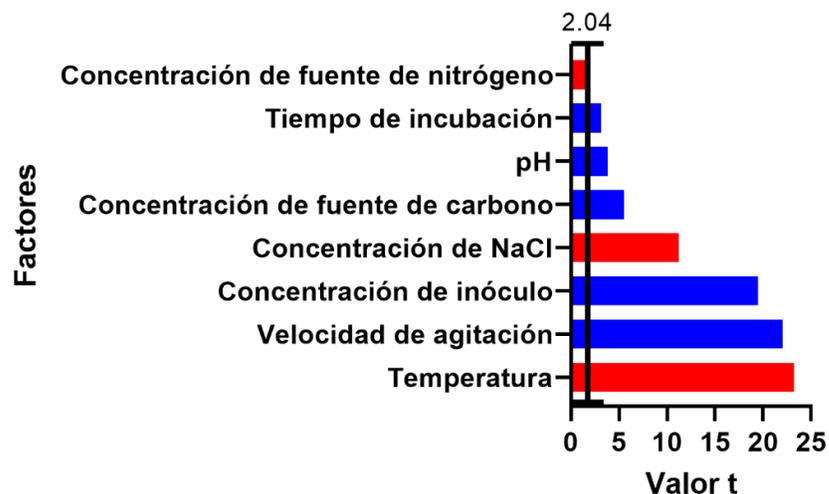


Figura 11. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de los factores implicados en la capacidad de captura de radicales ABTS de los extractos etanólicos crudos medida a 735nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los factores se analizaron mediante un diseño de Plackett Burman. Las barras representan el valor t de tres ensayos independientes. El color rojo representa los factores que presentan efecto negativo y el color azul los de efecto positivo en la absorbancia de los extractos crudos.

La capacidad de captura de radicales ABTS del extracto crudo producido se representó mediante una ecuación polinómica de primer orden (12), para la cepa Z9.2D8:

$$ABTS \text{ } G. \text{ hongkongensis } Z9.2D8 (\% \text{ capacidad captura de radicales}) = 36.174 + 4.303 A + 1.225 B + 0.333 C - 2.475 D + 0.846 E + 0.694 F - 5.137 G + 4.873 H \quad (12)$$

El modelo (12) $R^2 = 98.46\%$ indica que la mayor parte de la variabilidad de la respuesta puede atribuirse a las variables independientes y que sólo el 1.54% de las variaciones totales no se explican por las variables independientes. El valor del coeficiente de determinación ajustado ($Adj\text{ust } R^2=97.74\%$) indica la alta significación del modelo.

La cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 demostró su máxima capacidad de captura de radicales ABTS, alcanzando un destacado 82.90%, durante el ensayo No. 4. En esta corrida, se emplearon las siguientes condiciones experimentales: concentración de inóculo de 1 g/L, concentración de sacarosa de 2 g/L, concentración de extracto de malta de 10 g/L, concentración de extracto de levadura de 4 g/L, concentración de NaCl de 20 g/L, pH de 7.5, tiempo de incubación de 7 días, temperatura de 20°C y velocidad de agitación de 180 rpm. Por otro lado, el valor más bajo de capacidad de captura de radicales ABTS, que fue del 12.61%, se obtuvo en las corridas No. 3 y 19. Estas corridas se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: concentración de inóculo de 0.5 g/L, concentración de sacarosa de 2 g/L, concentración de extracto de malta de 5 g/L, concentración de extracto de levadura de 2 g/L, concentración de NaCl de 20 g/L, pH de 6.5, tiempo de incubación de 7 días, temperatura de 20°C y velocidad de agitación de 80 rpm.

El análisis estadístico ANOVA (consulte la Tabla S8) nos permite inferir, con un nivel de confianza del 95%, qué variables analizadas tienen una influencia estadísticamente significativa en la capacidad de captura de radicales ABTS, cuando el valor p es inferior a 0.05. Esta conclusión se respalda con el diagrama de Pareto (véase la Figura 12), el cual presenta el orden de significancia de las variables analizadas.

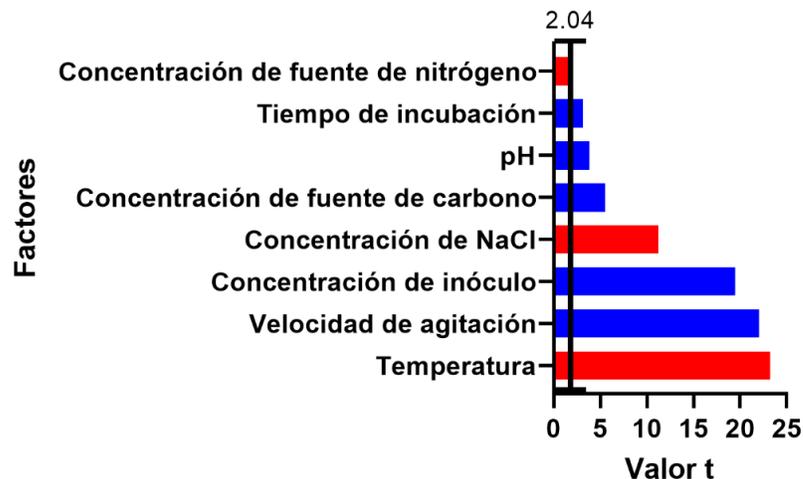


Figura 12. Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados de los factores implicados en la capacidad de captura de radicales ABTS de los extractos etanólicos crudos medida a 735nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los factores se analizaron mediante un

diseño de Plackett Burman. Las barras representan el valor t de tres ensayos independientes⁰¹. El color rojo representa los factores que presentan efecto negativo y el color azul los de efecto positivo en la absorbancia de los extractos crudos.

La capacidad de secuestro de radicales ABTS del extracto crudo producido se representó mediante una ecuación polinómica de primer orden (13), para la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5:

$$ABTS \text{ } G. \text{ } hongkongensis \text{ } G11.1D5 \text{ } (\% \text{ capacidad secuestro de radicales}) = 40.457 + 3.869 A - 0.911 B + 3.718 C - 0.612 D - 1.694 E + 1.335 F - 6.483 G + 14.612 H \quad (13)$$

El modelo (13) $R^2 = 99.69\%$ indica que la mayor parte de la variabilidad de la respuesta puede atribuirse a las variables independientes y que sólo el 0.41% de las variaciones totales no se explican por las variables independientes. El valor del coeficiente de determinación ajustado ($Adj R^2=99.55\%$) indica la alta significación del modelo.

Finalmente, con el objetivo de optimizar la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes, considerando las tres variables de respuesta mencionadas anteriormente (absorbancia del extracto crudo, capacidad de secuestro de radicales ABTS y DPPH), para ambas cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5), se asignó un peso del 50% a la absorbancia y otro 50% a la capacidad antioxidante, como se representa en la Figura 13.

Como resultado de este análisis, se determinó que, para ambas cepas de *G. hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5), las tres variables más significativas para maximizar la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes mediante un diseño de superficie de respuesta son la temperatura, la velocidad de agitación y la concentración de inóculo. Los valores óptimos de los parámetros restantes de los medios de cultivo se establecieron en función del mejor rendimiento para las tres variables de respuesta, como se detalla en la Tabla 3.

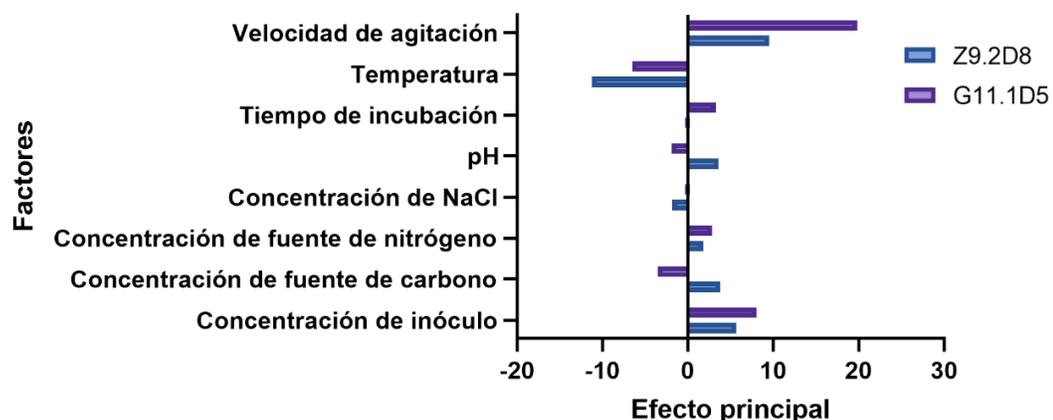


Figura 13. Diagrama de los efectos estandarizados principales de los factores implicados en la absorbancia y la capacidad de captura de radicales DPPH y ABTS de extractos etanólicos. *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivadas en medio GYM. La absorbancia se midió a 490 nm, la captura de radicales DPPH se midió a 515 nm y la captura de radicales ABTS se midió a 735 nm. Los factores se analizaron mediante un diseño de

Plackett Burman. Las barras representan la media de de los efectos de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar.

Tabla 3. Condiciones de cultivo para maximizar la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes, de las cepas de *G. hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5), según el diseño Plackett-Burman.

Factores	Cepa <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8	Cepa <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5
Concentración de fuente de carbono (g/L)	6	2
Concentración de fuente de nitrógeno (g/L)	14	14
Concentración de NaCl (g/L)	20	20
pH	7.5	6.5
tiempo de incubación (días)	7	14

Los resultados obtenidos en esta sección destacan la complejidad inherente a la fermentación de *actinobacterias* para la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. Este proceso se muestra altamente influenciado por diversos factores, que van más allá del rendimiento y los componentes del medio de cultivo. De hecho, se ha comprobado la crítica dependencia de condiciones ambientales específicas, como el volumen de inoculación, la temperatura y la velocidad de agitación, como elementos esenciales en la obtención de metabolitos bioactivos a partir de *actinobacterias* (Song et al., 2012). Esto concuerda con hallazgos previos, como los de El-Naggar et al., 2015, quienes han destacado que la agitación desempeña un papel fundamental en el aumento de la producción de metabolitos bioactivos en *actinobacterias*. La razón detrás de esta relación directa se encuentra en la influencia que tiene la agitación sobre la aireación y el suministro de oxígeno en el cultivo. En efecto, el oxígeno debe estar presente en cantidades adecuadas para satisfacer las demandas de crecimiento del organismo y la producción de los metabolitos deseados. Esto se debe a que los procesos de oxidación-reducción que ocurren en la mezcla de fermentación pueden ejercer una notable influencia química sobre la biosíntesis de los productos y la absorción de nutrientes por parte de las bacterias. Esta interacción puede resultar en un impacto beneficioso o perjudicial en la formación del producto final deseado. Por lo tanto, se convierte en un imperativo medir y controlar con precisión la agitación del cultivo.

Mohamedin et al., (2015) destacaron en su investigación, que el uso de una concentración adecuada de inóculo, en *actinobacterias*, puede desencadenar un rápido crecimiento del micelio y favorecer la formación del producto deseado. Esta práctica contribuye a la reducción de la contaminación por microorganismos, ya que una densidad de inóculo más elevada puede inhibir la producción de enzimas. Por otro lado, un exceso de biomasa puede agotar los nutrientes presentes en el sustrato o propiciar la acumulación de sustancias autoinhibidoras no volátiles que obstaculizan la formación del producto y una densidad de inóculo insuficiente puede dar lugar a una biomasa demasiado escasa, lo que podría inducir la formación no deseada del producto. En resumen, el equilibrio en la concentración de inóculo desempeña un papel crucial en la producción de metabolitos en *actinobacterias*, ya que influye tanto en el crecimiento del micelio como en la calidad y cantidad de los productos

obtenidos. Mantener una concentración óptima de inóculo es esencial para maximizar la eficiencia de la fermentación y garantizar la producción deseada, lo cual respalda el hecho de encontrar la concentración de inóculo como una variable significativa en la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes de las cepas estudiadas de *G. hongkongensis*.

La temperatura es uno de los parámetros ambientales más críticos que inciden en la tasa de crecimiento y la supervivencia de las *actinobacterias*, además de tener un impacto directo en la producción de metabolitos bioactivos. La temperatura óptima se define como aquella en la cual las reacciones metabólicas, catalizadas por enzimas, se desenvuelven con mayor eficiencia. Un desvío significativo de esta temperatura óptima puede conllevar a una disminución en la tasa de crecimiento debido a la desnaturalización y la inactivación de proteínas enzimáticas esenciales. Además, puede ocasionar el colapso de la membrana citoplasmática e, incluso en ciertas circunstancias, llevar a la lisis térmica de las bacterias (Wink et al., 2017). Estas afirmaciones permiten validar el hecho de que la temperatura haya sido encontrada como un factor crítico del proceso en estudio, puesto que incide profundamente en la biología de los microorganismos, incluyendo su metabolismo y capacidad para producir metabolitos secundarios. En ese hilo de pensamiento, mantener la temperatura en un rango cercano a la óptima es esencial para garantizar el crecimiento saludable y la producción eficiente de los compuestos deseados durante la fermentación.

La identificación de estos factores como altamente significativos, a través del análisis llevado a cabo mediante la metodología de Plackett Burman, es un hallazgo de gran relevancia en el contexto de la optimización de procesos biotecnológicos. Esto se debe a que estos factores ejercen un impacto significativo tanto en el crecimiento celular como en la producción de metabolitos secundarios (Caycedo Lozano et al., 2021). Además, la comprensión del comportamiento metabólico de los microorganismos en respuesta a diferentes estímulos ambientales no solo tiene implicaciones en el control de los niveles de los productos o metabolitos de interés, sino que también puede traducirse en la reducción de costos asociados a la fermentación.

A partir de los resultados obtenidos, se puede inferir que el comportamiento metabólico de ambas cepas presenta similitudes en aspectos como el tipo y concentración de sales, así como en la fuente y concentración de nitrógeno. Sin embargo, también se observan diferencias notables en cuanto a la fuente y concentración de carbono, el pH y el tiempo de incubación. Estas divergencias podrían atribuirse, en primer lugar, a las variaciones y semejanzas genéticas que pueden existir dentro de una misma especie bacteriana, las cuales influyen en su capacidad de adaptación a diferentes condiciones de medios y estímulos (Betancor et al., 2021). Esta característica es particularmente relevante en las *actinobacterias*, que poseen sistemas bioquímicos y genéticos complejos que les permiten sintetizar una amplia variedad de metabolitos secundarios con diversas propiedades bioactivas. Esto se debe a que los genes involucrados en la biosíntesis de estos metabolitos representan una parte significativa del genoma de estas bacterias. Además, estos genes son responsables de mecanismos de adaptación especializados que les permiten sobrevivir y prosperar en diversos entornos, incluyendo ambientes salinos, dulces, ácidos o alcalinos, así como en condiciones de alta o baja disponibilidad de nutrientes y durante períodos prolongados o cortos (Mariano Matías, 2009).

Es importante destacar que, a pesar de que ambas cepas tienen un origen marino, fueron aisladas de distintos simbiontes, con la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 procede de una esponja y la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 fue aislada de un octocoral. Esta diferencia

en los nichos de aislamiento representa un factor crítico en el desarrollo de su sofisticado metabolismo especializado y sirve como un indicador del éxito adaptativo y, por ende, de la plasticidad de su genotipo. Esta diversidad de nichos ecológicos y adaptaciones también ha sido documentada en el género *Gordonia*. Según estudios, este género posee un pan-genoma estimado en 57,901 genes, que están estrechamente relacionados con el metabolismo y el procesamiento de proteínas. Estos genes tienden a ser más uniformes dentro de cada especie, pero algunos de ellos solo se encuentran en ciertas cepas dentro de una misma especie (Sánchez-Suárez et al., 2022). Esto sugiere la existencia de diferencias, ya sean sutiles o significativas, en las condiciones de cultivo entre varias cepas de la misma especie de *Gordonia*.

3.1.6. Optimización mediante metodología de superficie de respuesta:

Se implementó un diseño Box-Behnken con el propósito de investigar los niveles óptimos y las interacciones entre los factores significativos seleccionados, tal como se detalla en la Tabla S2. En este proceso, se consideraron aquellos factores que ejercían un efecto tanto positivo como negativo, en la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. Las restantes variables del estudio se mantuvieron constantes en niveles previamente identificados como óptimos mediante la metodología de Plackett-Burman, como se mostró en las Tablas 1 y 2. Para cada cepa, se llevaron a cabo un total de 15 experimentos, por triplicado, abarcando diversas combinaciones de temperatura, concentración de inóculo y velocidad de agitación. El objetivo de estos experimentos fue maximizar los valores de absorbancia del extracto crudo con presencia de pigmento, así como la capacidad de captura de radicales DPPH y ABTS. Los resultados derivados de este diseño experimental se encuentran detallados en las Tablas 4 y 5, correspondientes a las cepas *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5, respectivamente.

Tabla 4. Diseño de superficie de respuesta Box-Behnken usado para mejorar la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. La absorbancia de los extractos etanólicos crudos fue medida a 490 nm, la capacidad de captura de radicales DPPH fue medida a 515 nm, la capacidad de captura de radicales ABTS fue medida a 735nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Corrida	Concentración inóculo (g/l)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	DPPH (%)	Absorbancia (490 nm)	ABTS (%)
1	0	1	-1	84.41	0.19	65.83
2	0	0	0	58.43	0.24	71.92
3	1	0	-1	78.92	0.31	84.10
4	1	-1	0	85.71	0.33	70.83
5	0	0	0	45.45	0.20	46.00
6	1	0	1	79.07	0.17	73.48
7	0	-1	1	75.06	0.15	49.61
8	1	1	0	35.18	0.05	29.74
9	-1	-1	0	51.07	0.31	51.46
10	-1	1	0	68.65	0.17	24.92

Corrida	Concentración inóculo (g/l)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	DPPH (%)	Absorbancia (490 nm)	ABTS (%)
11	0	-1	-1	42.81	0.14	27.84
12	-1	0	-1	58.72	0.14	64.11
13	0	1	1	51.31	0.08	27.26
14	0	0	0	62.62	0.32	53.96
15	-1	0	1	72.14	0.15	64.89
16	0	1	-1	82.82	0.20	69.27
17	0	0	0	58.43	0.28	71.76
18	1	0	-1	78.06	0.33	85.35
19	1	-1	0	87.03	0.38	76.61
20	0	0	0	41.69	0.17	47.87
21	1	0	1	74.02	0.20	76.76
22	0	-1	1	75.76	0.17	44.35
23	1	1	0	37.95	0.06	30.03
24	-1	-1	0	53.96	0.28	51.15
25	-1	1	0	67.26	0.16	25.50
26	0	-1	-1	37.78	0.16	27.55
27	-1	0	-1	61.18	0.17	65.67
28	0	1	1	54.95	0.08	32.52
29	0	0	0	57.28	0.23	57.08
30	-1	0	1	74.16	0.16	66.61
31	0	1	-1	85.99	0.20	71.14
32	0	0	0	56.99	0.31	73.17
33	1	0	-1	85.56	0.30	86.44
34	1	-1	0	88.74	0.40	73.79
35	0	0	0	45.59	0.18	50.68
36	1	0	1	83.54	0.18	75.20
37	0	-1	1	75.93	0.18	50.05
38	1	1	0	36.57	0.06	30.18
39	-1	-1	0	52.52	0.30	51.62
40	-1	1	0	73.16	0.17	21.70
41	0	-1	-1	44.89	0.16	29.74
42	-1	0	-1	62.76	0.14	59.90
43	0	1	1	47.66	0.05	33.39
44	0	0	0	63.05	0.22	58.96
45	-1	0	1	74.02	0.15	70.67
NIVELES						
-1	1	15	170			
0	1.5	20	180			

Corrida	Concentración inóculo (g/l)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	DPPH (%)	Absorbancia (490 nm)	ABTS (%)
1	2	25	190			

Tabla 5. Diseño de superficie de respuesta Box-Behnken usado para mejorar la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes. La absorbancia de los extractos etanólicos crudos fue medida a 490 nm, la capacidad de captura de radicales DPPH fue medida a 515 nm, la capacidad de captura de radicales ABTS fue medida a 735nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Corrida	Concentración inóculo (g/l)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	DPPH (%)	ABSORBANCIA (490 nm)	ABTS (%)
1	0	1	-1	77.65	0.28	83.14
2	0	0	0	13.31	0.51	93.95
3	1	0	-1	85.66	0.24	72.51
4	1	-1	0	63.12	0.23	58.31
5	0	0	0	11.44	0.79	94.47
6	1	0	1	63.48	0.65	98.01
7	0	-1	1	78.33	0.31	58.37
8	1	1	0	74.63	0.15	44.56
9	-1	-1	0	34.78	0.14	56.04
10	-1	1	0	50.60	0.13	34.95
11	0	-1	-1	75.54	0.26	79.06
12	-1	0	-1	66.84	0.23	79.21
13	0	1	1	46.79	0.18	37.24
14	0	0	0	19.57	0.45	85.51
15	-1	0	1	78.71	0.43	97.16
16	0	1	-1	79.35	0.31	83.14
17	0	0	0	21.60	0.53	93.78
18	1	0	-1	84.74	0.24	76.56
19	1	-1	0	61.90	0.25	59.92
20	0	0	0	10.75	0.78	94.93
21	1	0	1	67.64	0.57	98.01
22	0	-1	1	78.10	0.34	62.09
23	1	1	0	76.97	0.16	43.01
24	-1	-1	0	32.52	0.13	58.78
25	-1	1	0	55.50	0.12	32.62
26	0	-1	-1	75.39	0.30	83.79
27	-1	0	-1	70.04	0.22	80.43
28	0	1	1	43.39	0.22	34.49

Corrida	Concentración inóculo (g/l)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	DPPH (%)	ABSORBANCIA (490 nm)	ABTS (%)
29	0	0	0	22.40	0.46	85.34
30	-1	0	1	80.59	0.45	98.18
31	0	1	-1	77.81	0.30	82.13
32	0	0	0	18.11	0.55	93.78
33	1	0	-1	85.66	0.25	77.07
34	1	-1	0	62.84	0.25	63.02
35	0	0	0	11.67	0.81	94.62
36	1	0	1	62.09	0.60	98.01
37	0	-1	1	79.23	0.32	61.47
38	1	1	0	71.13	0.15	48.13
39	-1	-1	0	35.34	0.13	59.30
40	-1	1	0	60.39	0.13	36.03
41	0	-1	-1	75.70	0.31	85.47
42	-1	0	-1	69.10	0.22	77.99
43	0	1	1	50.50	0.20	32.05
44	0	0	0	23.71	0.48	85.68
45	-1	0	1	73.06	0.46	97.67
NIVELES						
-1	1	15	170			
0	1.5	20	180			
1	2	25	190			

3.1.6.1. Absorbancia del extracto crudo:

La cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 exhibió la absorbancia más alta del extracto crudo, registrando un valor de 0.40 durante la corrida No.34, en la que se emplearon las siguientes condiciones: concentración del inóculo (2 g/L), temperatura (15 °C) y velocidad de agitación (180 rpm). Por otro lado, el valor más bajo de absorbancia (0.05) se obtuvo en la corrida No.8, en la que se aplicaron las siguientes condiciones: concentración de inóculo (2 g/L), temperatura (25°C) y velocidad de agitación (180 rpm).

El análisis estadístico ANOVA (Tabla S9) de la absorbancia nos permitió determinar, con un nivel de confianza del 95%, cuáles variables son estadísticamente significativas en la producción de pigmentos, expresada en términos de absorbancia, cuando el valor p es inferior a 0.05. Se encontró que la concentración de inóculo, la temperatura y la velocidad de agitación, así como sus interacciones, mantuvieron su significancia, con la excepción de la interacción doble entre la concentración de inóculo y otras variables.

La absorbancia del extracto crudo producido por la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 se modeló mediante una ecuación polinómica de segundo orden en función de las variables independientes:

$$\text{Absorbancia extracto crudo (G. hongkongensis Z9.2D8)} = -17.53 - 1.815 A + 0.1429 G + 0.2014 H + 0.074 A^2 - 0.001 G^2 - 0.001 H^2 + 0.018A*G + 0.006 A*H - 0.001 G*H \quad (14)$$

A: concentración inóculo (g/L)

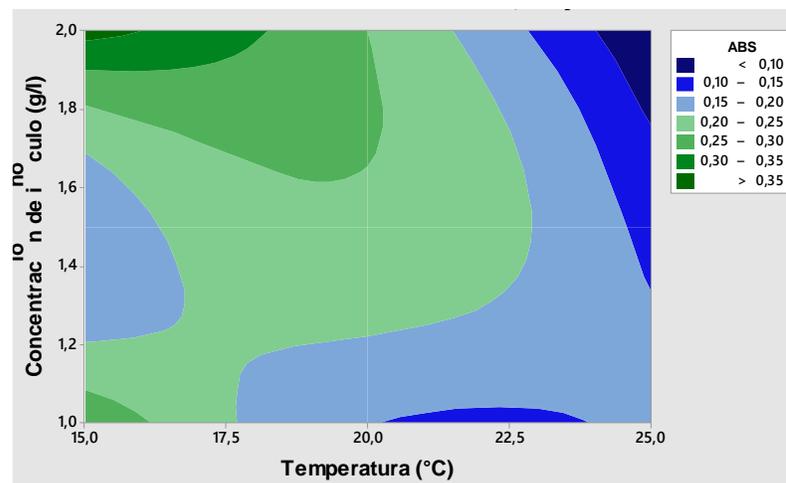
G: Temperatura (°C)

H: velocidad de agitación (rpm)

Los datos del ANOVA (Tabla S9) se analizaron mediante una regresión múltiple y la bondad del modelo se comprobó mediante el coeficiente de determinación (R^2), que resultó ser de 0.8866. El diagrama de probabilidad normal (Figura 14) de los residuos muestra que los puntos se aproximan a la línea y el valor p es igual a 0.08, por lo que los residuos parecen tener una distribución normal, lo que indica que el modelo se ajustó a los resultados experimentales. Como los residuos del modelo ajustado se distribuían normalmente, se han validado todos los supuestos principales del modelo.

Los efectos de interacción y los niveles óptimos de las variables se determinaron mediante gráficos de contorno, que representan la relación tridimensional en dos dimensiones cuando una de las variables se mantiene constante en su valor óptimo mientras que las otras dos varían. En la figura 13 se observa el comportamiento cuando dos de las variables que influyen en la absorbancia del extracto crudo interactúan, y la tercera variable se mantiene en su valor óptimo. Estas representaciones gráficas muestran que la producción máxima de pigmento se alcanza cuando hay interacción entre una alta concentración de inóculo y un bajo nivel de temperatura (Figura 14a) o velocidad de agitación (Figura 14b). Asimismo, se observa que la producción óptima también se logra cuando existe interacción entre una baja temperatura y un nivel medio de agitación (Figura 14c). En contraste, otras combinaciones de los factores estudiados resultan en absorbancias medias o bajas del extracto crudo.

(a)



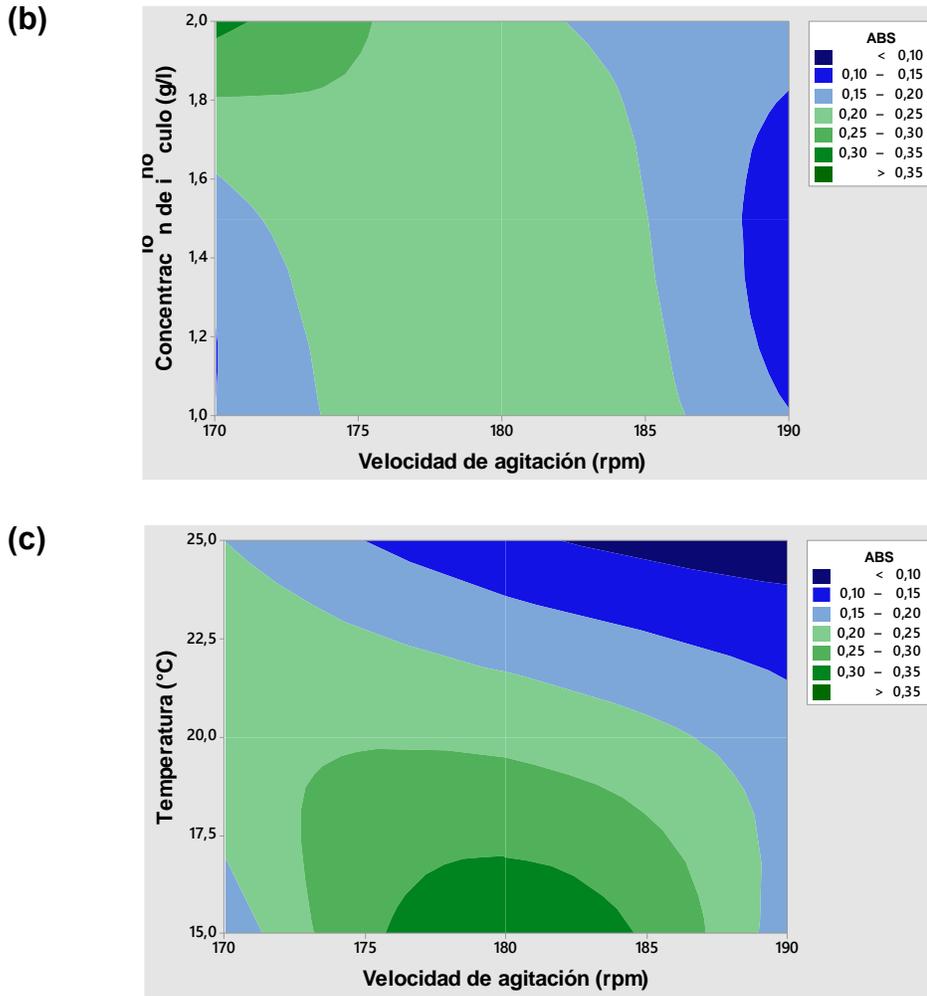


Figura 14. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta muestran el efecto sobre la absorbancia del extracto crudo de la interacción entre (a) la temperatura y la concentración de inóculo con la velocidad de agitación en el nivel óptimo (b) y la velocidad de agitación y la concentración de inóculo con la temperatura en el nivel óptimo (c) la temperatura y la velocidad de agitación y su efecto mutuo sobre la absorbancia del extracto crudo con la concentración de inóculo en el nivel óptimo. Absorbancia del extracto crudo medida a 490 nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivado en medio GYM modificado. Los factores se analizaron mediante un diseño Box-Behnken. El contorno representa la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar.

La cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 mostró la absorbancia más elevada del extracto crudo (0.81) en la corrida No.35 (Concentración del inóculo (1.5 g/L); temperatura (20 °C); velocidad de agitación (180 rpm)) y el valor más bajo (0.05) se obtuvo en la corrida No.25 (Concentración de inóculo (1 g/L); temperatura (25°C); velocidad de agitación (180 rpm)). El análisis estadístico ANOVA (Tabla S10) de la absorbancia permite inferir, con un nivel de confianza del 95%, qué variables son estadísticamente significativas para la absorbancia del pigmento producido. La velocidad de agitación y su interacción doble siguieron siendo significativas, así como la interacción doble de la concentración de inóculo.

La absorbancia del extracto crudo producido de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 se representó mediante una ecuación polinómica de segundo orden en función de las variables independientes:

$$\text{Absorbancia extracto crudo (G. hongkongensis G11.1D5)} = 23.8 + 0.99 A + 0.550 G + 0.195 H - 0.656 A^2 - 0.011 G^2 - 0.001 H^2 - 0.001 A*G + 0.01 A*H - 0.001 G*H \quad (15)$$

A: Concentración de inóculo (g/L)

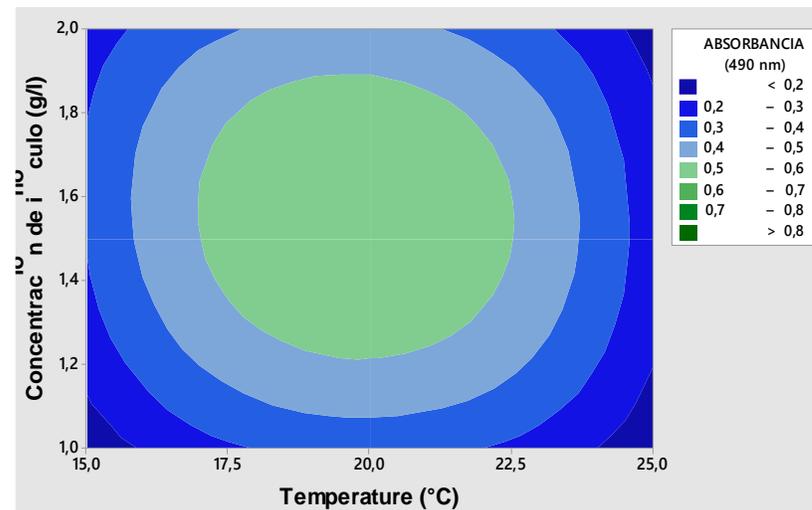
G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

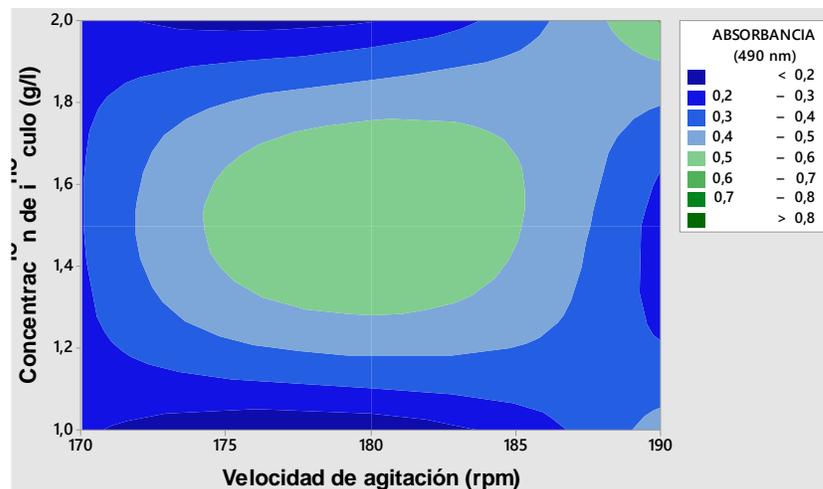
Los datos del ANOVA (Tabla S10) se analizaron mediante una regresión múltiple y la bondad del modelo se comprobó mediante el coeficiente de determinación (R^2), que resultó ser de 0.8743. La Figura 15 muestra que la mayor producción de pigmento ocurrió cuando hay interacción entre los valores medios de concentración de inóculo y temperatura (Figura 15a) o de concentración de inóculo y velocidad de agitación (Figura 15b). Estos valores también se alcanzaron cuando hay interacción entre un nivel medio de temperatura y un nivel medio de agitación (Figura 15c). Otras combinaciones de los factores estudiados generan absorbancias medias o bajas del extracto crudo.

El diagrama de probabilidad normal (Figura S10) de los residuos muestra que los puntos se aproximan a la línea y el valor p es igual a 0.06, por lo que los residuos parecen tener una distribución normal, lo que indica que el modelo se ajustó a los resultados experimentales. Dado que los residuos del modelo ajustado se distribuían normalmente, se han validado todos los supuestos principales del modelo.

(a)



(b)



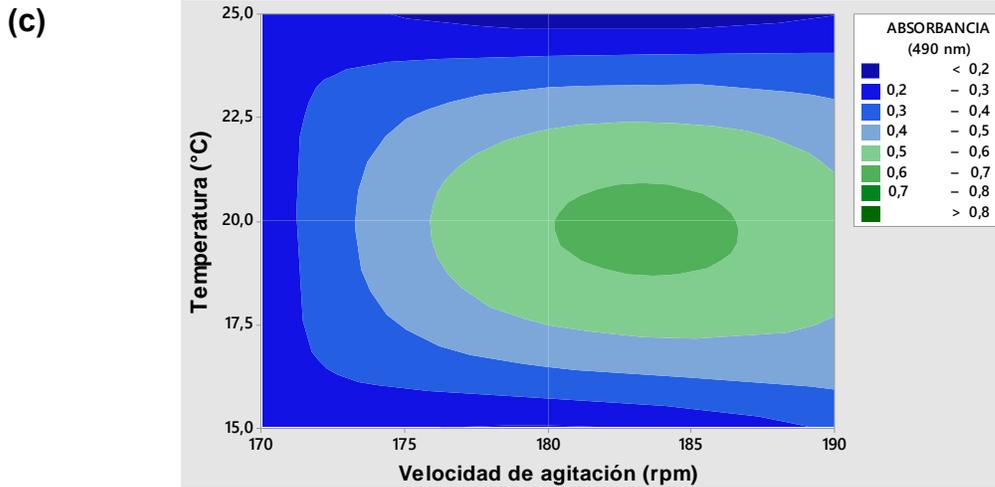


Figura 15. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta muestran el efecto sobre la absorbancia del extracto crudo de la interacción entre (a) la temperatura y la concentración de inóculo con la velocidad de agitación en el nivel óptimo (b) y la velocidad de agitación y la concentración de inóculo con la temperatura en el nivel óptimo (c) la temperatura y la velocidad de agitación y su efecto mutuo sobre la absorbancia del extracto crudo con la concentración de inóculo en el nivel óptimo. Absorbancia del extracto crudo medida a 490 nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivado en medio GYM modificado. Los factores se analizaron mediante un diseño Box-Behnken. El contorno representa la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar.

3.1.6.2. Capacidad de captura de radicales DPPH:

La mayor capacidad de secuestro de radicales DPPH de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 (88.74%) se alcanzó en el ensayo No.34 (concentración de inóculo (2 g/L); temperatura (15°C); velocidad de agitación (180 rpm)) y el valor más bajo (35.18%) se obtuvo en la corrida No.8 (Concentración de inóculo (2 g/L); temperatura (25°C); velocidad de agitación (180 rpm)). El análisis estadístico ANOVA (Tabla S11) de la capacidad de captura de radicales DPPH permite inferir, con un nivel de confianza del 95%, que la concentración de inóculo, la temperatura, la velocidad de agitación y sus interacciones siguieron siendo significativas, excepto la doble interacción de la velocidad de agitación y la interacción entre la concentración de inóculo y la velocidad de agitación.

Una ecuación polinómica de segundo orden que representa la capacidad de secuestro de radicales DPPH de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8, en función de las variables independientes:

$$DPPH \text{ } G. \text{ hongkongensis } Z9.2D8 (\% \text{ capacidad secuestro de radicales}) = 2684 - 376.9 A + 52.15 G - 31.92 H + 34.64 A^2 - 0.0629 G^2 + 0.1046 H^2 + 6.776 A * G + 0.726 A * H - 0.3343 G * H \quad (16)$$

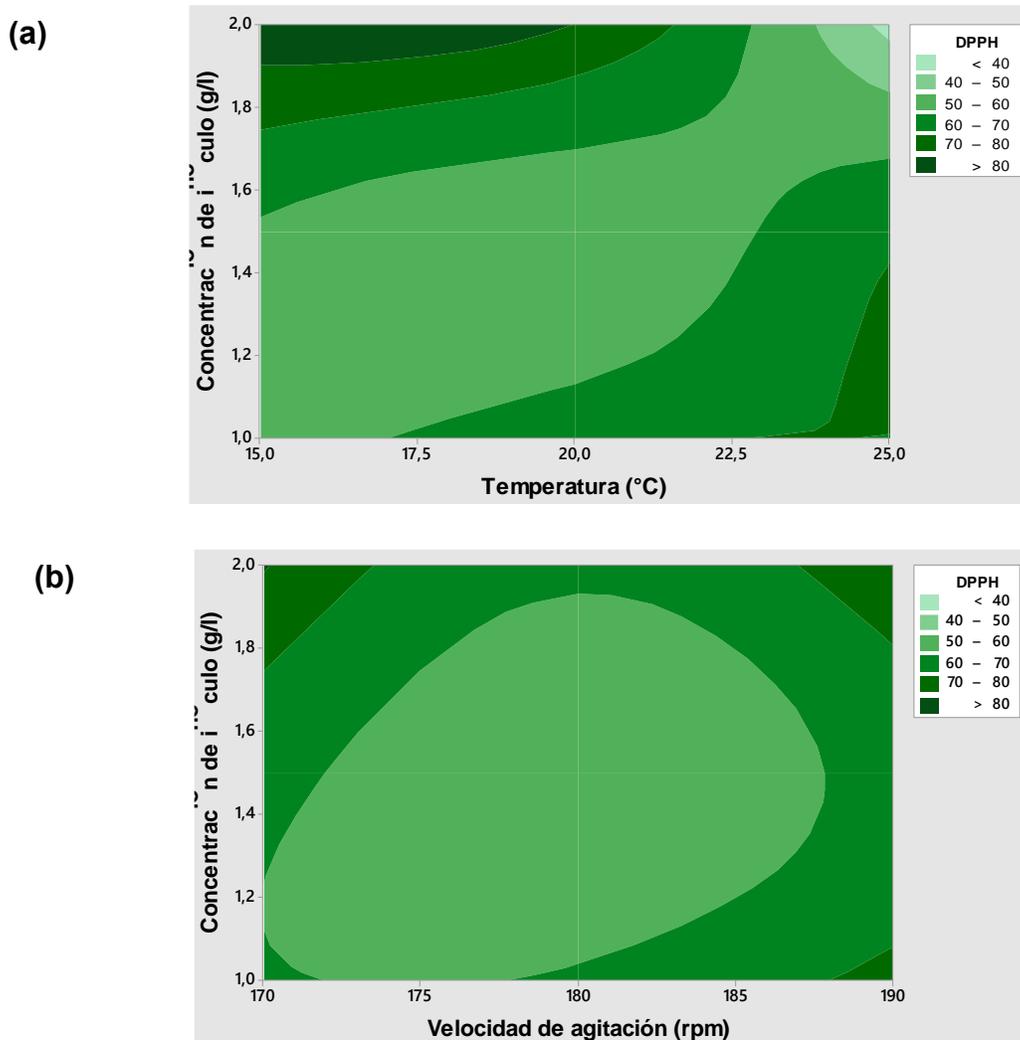
A: Concentración de inóculo (g/L)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Los datos del ANOVA (Tabla S11) fueron sometidos a un análisis de regresión múltiple, y la calidad del modelo se evaluó utilizando el coeficiente de determinación (R^2), que resultó ser igual a 0.8280. La Figura 16 ilustra la capacidad de captura de radicales DPPH cuando dos de las variables estudiadas interactúan, mientras que la tercera se mantiene en su nivel óptimo. Se observa que el nivel más alto de capacidad antioxidante se alcanza cuando existe una interacción entre una alta concentración de inóculo y una temperatura en un rango medio-bajo (Figura 16a). De igual manera, se obtiene un alto valor de capacidad antioxidante cuando interactúan una alta concentración de inóculo y niveles tanto altos como bajos de velocidad de agitación (Figura 16b). Además, se registra un aumento significativo en la capacidad antioxidante cuando interactúan niveles bajos de temperatura y agitación (Figura 16c). Por otro lado, otras combinaciones de factores conducen a una disminución en la capacidad de captura del radical DPPH.

El diagrama de probabilidad normal (Figura S11) de los residuos muestra que los puntos se aproximan a la línea y el valor p es igual a 0.08, por lo que los residuos parecen tener una distribución normal, lo que indica que el modelo se ajustó a los resultados experimentales. Dado que los residuos del modelo ajustado se distribuyen normalmente, se han validado todos los supuestos principales del modelo.



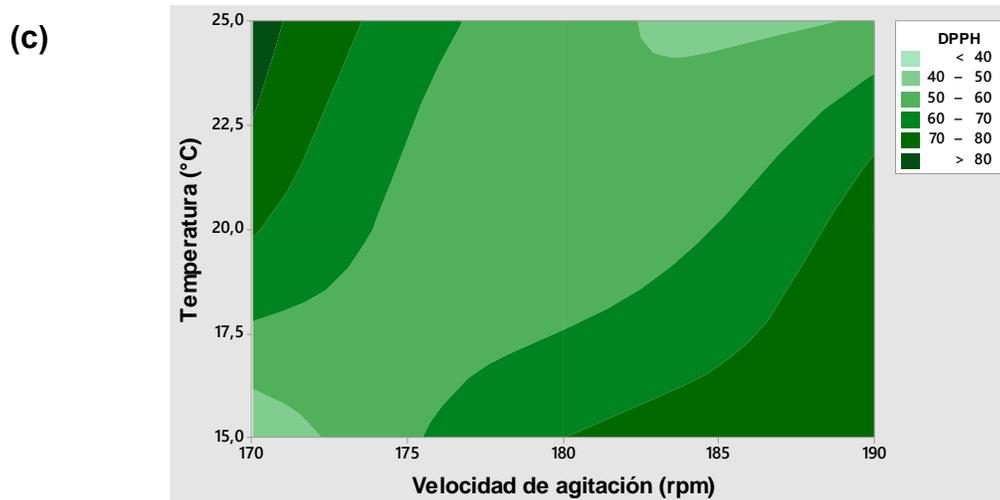


Figura 16. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta muestran el efecto sobre la capacidad de captura de radicales DPPH del extracto crudo de la interacción entre (a) la temperatura y la concentración de inóculo con la velocidad de agitación en el nivel óptimo (b) la velocidad de agitación y la concentración de inóculo con la temperatura en el nivel óptimo (c) la temperatura y la velocidad de agitación con la concentración de inóculo en el nivel óptimo. Secuestro del radical DPPH en el extracto crudo medida a 515 nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivado en medio GYM modificado. Los factores se analizaron mediante un diseño Box-Behnken. El contorno representa la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar.

La mayor capacidad de secuestro de radicales DPPH de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 (85.66%) se alcanzó en los ensayos No.3 y 33 (concentración de inóculo (2 g/L); temperatura (20°C); velocidad de agitación (170 rpm)) y el valor más bajo (10.75%) se obtuvo en la corrida No.8 (Concentración de inóculo (1.5 g/L); temperatura (20°C); velocidad de agitación (180 rpm)). El análisis estadístico ANOVA (Tabla S12) de la actividad de captura de radicales DPPH permite inferir, con un nivel de confianza del 95%, qué variables son estadísticamente significativas. La velocidad de agitación y sus interacciones siguieron siendo significativas, así como la interacción doble de la concentración de inóculo y la temperatura.

Una ecuación polinómica de segundo orden que representa la capacidad de secuestro de radicales libres de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5, en función de las variables independientes:

$$\begin{aligned}
 \text{DPPH } G. \text{ hongkongensis } G11.1D5 \text{ (\% capacidad secuestro de radicales)} = & 10890 \\
 & + 36,6 A \quad + 4.1 G \quad - 121.18 H \quad + 87.7 A^2 + 0.711 G^2 + 0.351 H^2 - 0.966 A*G \\
 & - 1.487 A*H \quad - 0.172 G*H
 \end{aligned}
 \tag{17}$$

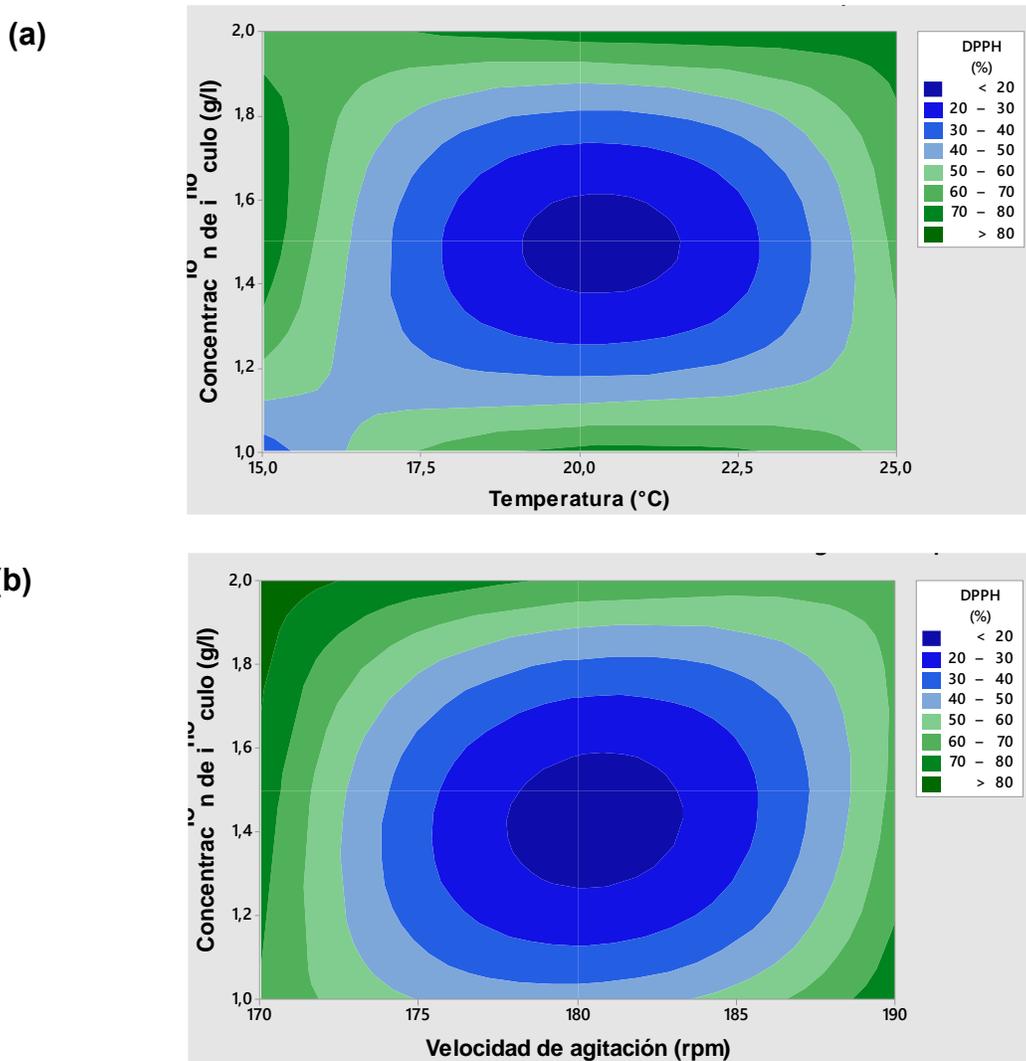
A: Concentración de inóculo (g/l)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Los datos del ANOVA (Tabla S12) se analizaron mediante una regresión múltiple y la bondad del modelo se comprobó mediante el coeficiente de determinación (R^2), que resultó ser de 0.8984. El diagrama de probabilidad normal (Figura S12) de los residuos muestra que los puntos se aproximan a la línea y el valor p es igual a 0.07, por lo que los residuos parecen tener una distribución normal, lo que indica que el modelo se ajustó a los resultados experimentales. Dado que los residuos del modelo ajustado se distribuyen normalmente, se han validado todos los supuestos principales del modelo.

La Figura 17 revela que el nivel más alto de capacidad antioxidante se obtuvo al producirse una interacción entre el nivel medio de concentración de inóculo y el nivel bajo de temperatura (Figura 17a). De manera similar, se observa un aumento significativo en la capacidad antioxidante cuando interactuaron los niveles más altos de concentración de inóculo con los niveles más bajos de velocidad de agitación (Figura 17b). Además, se registró un valor elevado de capacidad antioxidante cuando interactúan los niveles más bajos de velocidad de agitación con los tres niveles de temperatura (Figura 17c). Por otro lado, otras combinaciones de factores resultaron en una disminución de la capacidad de captura del radical DPPH.



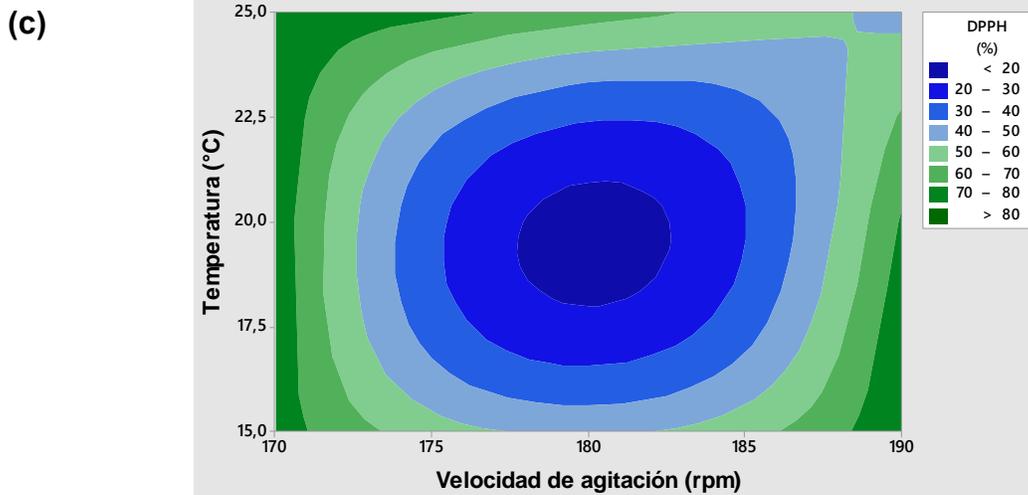


Figura 17. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta muestran el efecto sobre la capacidad de captura de radicales DPPH del extracto crudo de la interacción entre (a) la temperatura y la concentración de inóculo con la velocidad de agitación en el nivel óptimo (b) la velocidad de agitación y la concentración de inóculo con la temperatura en el nivel óptimo (c) la temperatura y la velocidad de agitación con la concentración de inóculo en el nivel óptimo. Secuestro del radical DPPH en el extracto crudo medida a 515 nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivado en medio GYM modificado. Los factores se analizaron mediante un diseño Box-Behnken. El contorno representa la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar.

3.1.6.3. Capacidad de captura de radicales ABTS:

Los resultados de capacidad de secuestro de radicales ABTS muestran que la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 alcanzó su nivel más alto de capacidad antioxidante (86.44%) en el ensayo No.33, donde se utilizaron una concentración de inóculo de 2 g/L, una temperatura de 20°C y una velocidad de agitación de 170 rpm. En contraste, el valor más bajo (21.70%) se obtuvo en la corrida No.40, que empleó una concentración de inóculo de 1 g/L, una temperatura de 25°C y una velocidad de agitación de 180 rpm. El análisis de varianza (ANOVA) de la capacidad de captura de radicales ABTS (Tabla S13) confirma que la concentración de inóculo, la velocidad de agitación y sus interacciones dobles siguen siendo estadísticamente significativas para esta capacidad antioxidante, al igual que la interacción entre la velocidad de agitación y la temperatura. Estos hallazgos subrayan la importancia de estas variables en la producción de metabolitos antioxidantes por parte de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8.

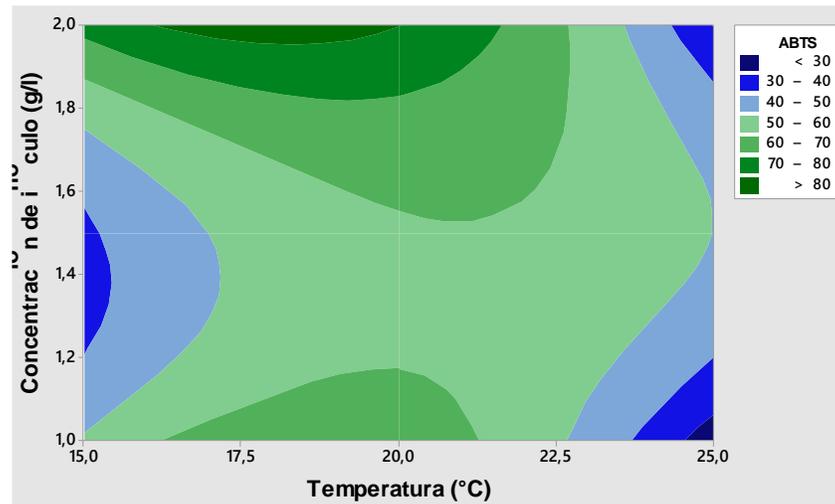
Una ecuación polinómica de segundo orden que representa la capacidad de secuestro de radicales ABTS, en función de las variables independientes, para la cepa Z9.2D8:

$$\begin{aligned}
 \text{ABTS } G. \text{ hongkongensis } Z9.2D8 \text{ (\% capacidad secuestro de radicales)} = & 1192 \\
 & - 263 A + 82.3 G - 19.0 H + 28.9 A^2 - 0.859 G^2 + 0.065 H^2 + 1.64 A*G + 0.716 A*H \\
 & - 0.287 G*H
 \end{aligned}
 \tag{18}$$

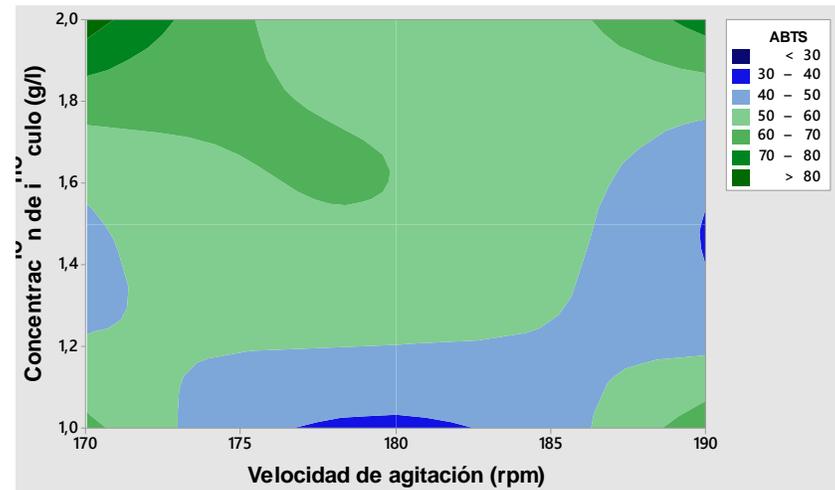
A: Concentración de inóculo (g/l)
 G: Temperatura (°C)
 H: Velocidad de agitación (rpm)

Los datos del ANOVA (Tabla S13) se analizaron mediante una regresión múltiple y la bondad del modelo se comprobó mediante el coeficiente de determinación (R^2), que arrojó un valor de 0.8555. Además, se realizó un análisis de normalidad de los residuos a través de un diagrama de probabilidad normal (Figura S13), el cual mostró que los puntos se aproximan a la línea y el valor p es igual a 0.06. Esto sugiere que los residuos siguen una distribución normal, lo que valida los supuestos fundamentales del modelo y respalda su aplicabilidad a los datos experimentales.

(a)



(b)



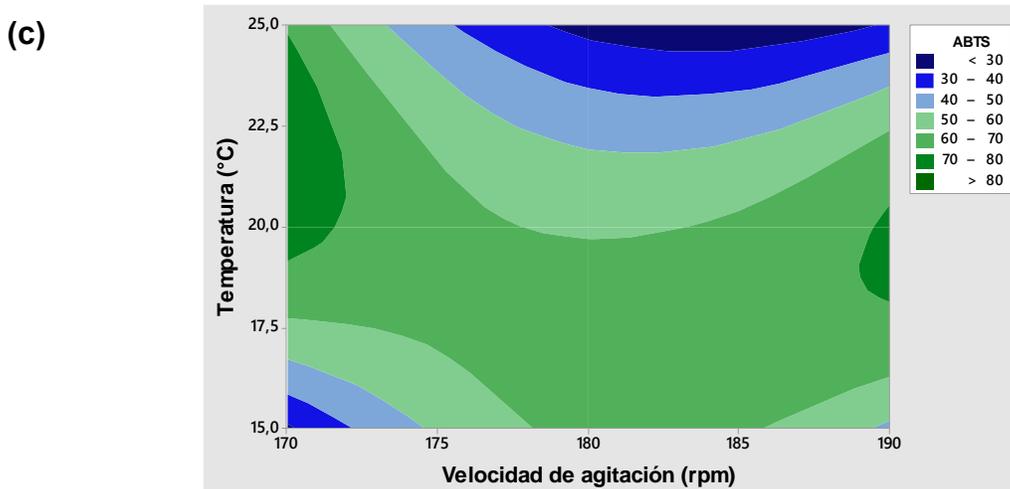


Figura 18. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta muestran el efecto sobre el extracto crudo de la capacidad de secuestro de radicales ABTS de la interacción entre (a) la temperatura y la concentración de inóculo con la velocidad de agitación en el nivel óptimo (b) la velocidad de agitación y la concentración de inóculo con la temperatura en el nivel óptimo (c) la temperatura y la velocidad de agitación con la concentración de inóculo en el nivel óptimo. Captura de radicales ABTS en el extracto crudo medida a 735 nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivado en medio GYM modificado. Los factores se analizaron mediante un diseño Box-Behnken. El contorno representa la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar.

La Figura 18 ilustra la capacidad de secuestro del radical ABTS cuando dos de las variables estudiadas interactúan, manteniendo la tercera variable en su nivel óptimo. Se observa que los valores más altos de capacidad antioxidante se alcanzaron cuando hubo una interacción entre concentraciones elevadas de inóculo y niveles moderados de temperatura (Figura 18a), o cuando se combinaron niveles más altos o más bajos de velocidad de agitación con concentraciones de inóculo elevadas (Figura 18b). Además, se observó una mayor capacidad antioxidante cuando interactuó el nivel más bajo de velocidad de agitación con el nivel más alto de temperatura (Figura 18c). La combinación de otras variables podría disminuir la capacidad de secuestro del radical ABTS.

Los resultados de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 revelaron que la capacidad de captura de radicales ABTS alcanzó su punto máximo (98.18%) en el ensayo No.30, donde la concentración de inóculo fue de 1 g/L, la temperatura se mantuvo a 20°C y la velocidad de agitación fue de 190 rpm. Por otro lado, se registró la actividad más baja (32.05%) en la corrida No.43, con una concentración de inóculo de 1.5 g/L, una temperatura de 25°C y una velocidad de agitación de 190 rpm. El análisis de varianza (ANOVA) de estos datos (Tabla S14) permitió identificar con un 95% de confianza las variables estadísticamente significativas para la actividad antioxidante ABTS, donde se observó que la velocidad de agitación y su interacción doble continuaron siendo significativas, al igual que la interacción doble de la concentración del inóculo.

Una ecuación polinómica de segundo orden que representa la capacidad de secuestro de radicales ABTS, en función de las variables independientes, para la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5:

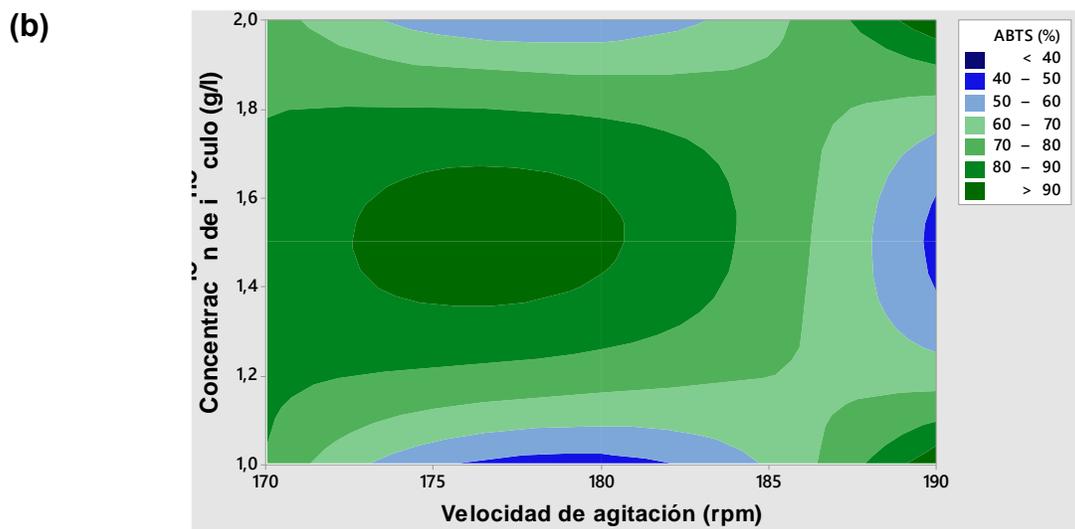
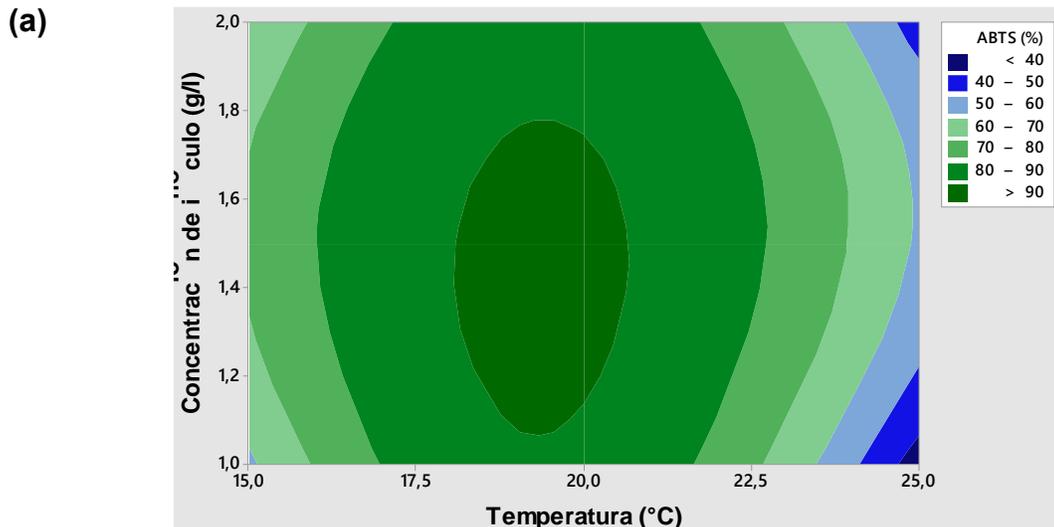
ABTS G. hongkongensis G11.1D5 (% capacidad secuestro de radicales) = $1120 + 65 A + 71.9 G - 19.4 H - 38.8 A^2 - 1.283 G^2 + 0.059 H^2 + 0.83 A \cdot G + 0.208 A \cdot H - 0.130 G \cdot H$ (19)

A: Concentración de inóculo (g/l)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los datos, como se muestra en la Tabla S14. Posteriormente, se sometieron los datos a un análisis de regresión múltiple, y se evaluó la calidad del modelo utilizando el coeficiente de determinación (R²), el cual resultó ser de 0.8519. Además, se llevó a cabo un análisis de probabilidad normal de los residuos, que se presenta en la Figura S14. En este análisis, se observó que los puntos se aproximan a la línea esperada y que el valor p es igual a 0.06, lo que sugiere que los residuos presentan una distribución normal. Estos hallazgos indican que el modelo se ajustó adecuadamente a los resultados experimentales, validando así todos los supuestos principales del modelo.



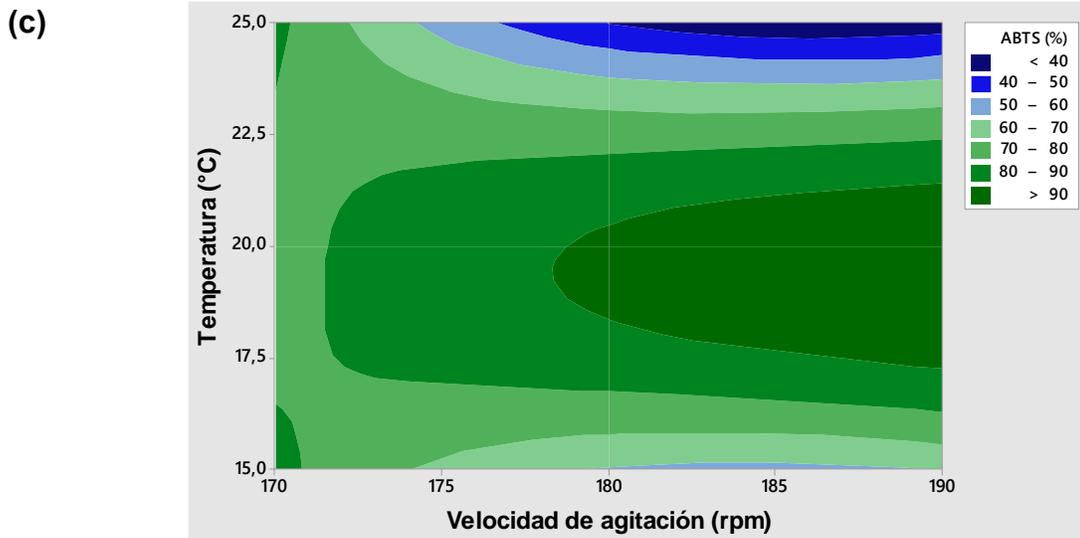


Figura 19. Gráficos de contorno de la superficie de respuesta muestran el efecto sobre el extracto crudo de la capacidad de secuestro de radicales ABTS de la interacción entre (a) la temperatura y la concentración de inóculo con la velocidad de agitación en el nivel óptimo (b) la velocidad de agitación y la concentración de inóculo con la temperatura en el nivel óptimo (c) la temperatura y la velocidad de agitación con la concentración de inóculo en el nivel óptimo. Captura de radicales ABTS en el extracto crudo medida a 735 nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivado en medio GYM modificado. Los factores se analizaron mediante un diseño Box-Behnken. El contorno representa la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar.

La Figura 19 ilustra que la mayor capacidad de secuestro de radicales libres ABTS en los extractos crudos de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 se obtuvo cuando se presentó interacción entre un nivel medio-alto y medio-bajo de concentración de inóculo, junto con niveles medios de temperatura (Figura 19a). Asimismo, se alcanzó la mayor capacidad antioxidante mediante la interacción de los niveles medios de concentración de inóculo y agitación (Figura 19b). Además, se observó que los niveles más altos de agitación y las temperaturas medias producen la mayor capacidad antioxidante (Figura 19c). Sin embargo, otras combinaciones de factores podrían disminuir la capacidad antioxidante del extracto.

3.1.6.4. Condiciones óptimas de cultivo:

Con el objetivo de mejorar la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes a través de las tres variables de respuesta mencionadas previamente (absorbancia del extracto crudo, capacidad de captura de radicales DPPH y ABTS), se eligieron los niveles óptimos de temperatura, velocidad de agitación y concentración de inóculo que maximizaran los valores de estas variables de respuesta, simultáneamente, en ambas cepas de interés. Los valores óptimos se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de cultivo para mejorar la absorbancia del extracto crudo y la capacidad antioxidante DPPH y ABTS, de las cepas de *G. hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5), según el diseño de superficie de respuesta.

Factores	Cepa <i>G. hongkongensis</i> Z9.2D8	Cepa <i>G. hongkongensis</i> G11.1D5
Concentración de inóculo (g/L)	2	1.89
Temperatura (°C)	16	18
Velocidad de agitación (rpm)	185	190

La capacidad de los microorganismos para sintetizar metabolitos especializados, como pigmentos y sustancias con actividad antioxidante, depende directamente de las condiciones ambientales y de cultivo. Estas variables son directamente responsables de maximizar o minimizar los metabolitos deseados. En consecuencia, es esencial encontrar y optimizar la combinación adecuada de condiciones de cultivo (Fatima & Anuradha, 2022). Yolmeh et al. (2017) estudiaron la producción de un pigmento natural con actividad antioxidante y obtuvieron resultados similares a la presente optimización. Ellos produjeron un pigmento identificado por análisis espectrofotométrico como un carotenoide intracelular, a partir de la cepa *Micrococcus roseus* y encontraron que la velocidad de agitación tuvo una influencia positiva sobre la producción del pigmento y se incrementó a 180 rpm, lo que permite inferir que en la producción de pigmentos con actividad antioxidante, agitaciones cercanas a 180 rpm permiten en algunas *actinobacterias* obtener el oxígeno disuelto requerido para llevar a cabo la síntesis de este tipo de metabolitos especializados (El naggar, 2015). Algunos estudios de producción de pigmentos a partir de *Micrococcus* sp. han demostrado que la concentración de inóculo también ejerce un efecto positivo en el aumento de la generación de pigmentos, que ha alcanzado su óptimo a una concentración de inóculo de 2g/L (Fatima & Anuradha, 2022). Este resultado, similar al obtenido en nuestro estudio de optimización, permite inferir que en algunas *actinobacterias* esta concentración de inóculo es adecuada para promover un rápido crecimiento micelial y favorecer así la producción de pigmento y metabolitos antioxidantes (Mohamedin et al., 2015).

Diversos estudios sobre la producción de metabolitos especializados en *actinobacterias*, como pigmentos y antioxidantes, especifican que la máxima producción de estos metabolitos se produce en un rango de temperatura entre 30 y 40°C (Fatima & Anuradha, 2022). Sin embargo, cabe señalar que varios estudios han demostrado que los pigmentos bacterianos se sintetizan en condiciones de protección de las células microbianas frente al exceso de rayos UV, el fotodaño, la salinidad fluctuante, los ciclos de congelación-descongelación y las bajas temperaturas (Mueller et al., 2005; Kumar et al., 2021). Además, los carotenoides son uno de los pigmentos más citados de hábitats fríos variables, como un fiordo glaciario, el mar Caspio, la Antártida, los glaciares alpinos italianos y el Himalaya (Morgenstern et al., 2005; Kumar et al., 2021). Esta información apoya los resultados de nuestro estudio y el hecho de que la temperatura ha ejercido un efecto negativo sobre la producción de carotenoides en *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5, sobre la producción de pigmentos y la capacidad antioxidante.

3.1.6.5. Validación del modelo:

Los valores óptimos de las variables analizadas, que fueron obtenidos a partir de la optimización, se sometieron a una verificación experimental y se compararon con los datos predichos. En el caso de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8, la absorbancia medida del extracto crudo fue de 0.32, mientras que el valor predicho por el modelo fue de 0.31. La capacidad de captura de radicales DPPH medida fue del 84.61%, en comparación con el valor del modelo que fue del 88.67%. Por último, la capacidad de captura de radicales ABTS medida fue del 79.77%, mientras que el valor predicho por el modelo fue del 71.35%. Estos resultados de verificación revelaron un alto grado de precisión en los modelos, con una precisión del 96.77%, 95.42% y 89.44%, respectivamente.

Para la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5, se obtuvo una absorbancia medida de 0.53, mientras que el valor predicho por el modelo fue de 0.56. La capacidad de captura de radicales DPPH medida fue del 68.72%, en comparación con el valor del modelo que fue del 65.14%. Por último, la capacidad de secuestro de radicales ABTS medida fue del 88.00%, mientras que el valor predicho por el modelo fue del 90.07%. En este caso, también se logró un alto grado de precisión en los modelos, con valores de precisión del 94.64%, 94.79% y 97.70%, respectivamente.

Estos resultados de verificación indican que los modelos de ambas cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5) se consideran probados y precisos en el espacio experimental seleccionado.

Es importante destacar que, al utilizar las condiciones de cultivo óptimas, se logró obtener un rendimiento de extracción de 0.9 mg de extracto por gramo de biomasa para la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 y 0.7 mg de extracto por gramo de biomasa para la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5. Este resultado sugiere la posibilidad de un aumento en la concentración de pigmentos y compuestos antioxidantes logrados durante el proceso de optimización.

CAPÍTULO 3.2. COMPUESTOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS CRUDOS RESPONSABLES DE LAS BIOACTIVIDADES

La metodología de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) se empleó para identificar las posibles sustancias responsables de las bioactividades de interés, como la producción de pigmento y la actividad antioxidante, presentes en los extractos de las cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5). En el proceso de selección de los posibles compuestos, se descartaron aquellos que presentaban un error mayor a 10 ppm en comparación con el peso molecular de pico.

Al analizar el cromatograma del extracto crudos con presencia de pigmento y capacidad antioxidante de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8, se identificó un pico en 1150.85 m/z con una intensidad de 20752 y un tiempo de retención de 26.3 (área: 7014.2). Este pico mostró similitud en la base de datos de CEUMASS web con los aductos 2M+NH₄, que corresponden a la 3-Hidroxi-b,e-caroten-3'-ona (C₄₀H₅₄O₂) (Figura 21a). Esta sustancia pertenece a la familia de los carotenoides, los cuales se conocen por su contribución tanto a la pigmentación como a la actividad antioxidante. Es importante destacar que este pico presentó un aumento en el área cuando el metabolito pigmentado con actividad antioxidante se produjo en un medio de cultivo con almidón como fuente de carbono (área: 9300), pero no se identificó cuando se intentó producir el metabolito de interés en un medio de cultivo

con glicerol, como fuente de carbono. Este hallazgo respalda la relación entre la actividad antioxidante y la absorbancia, ya que ambos aumentaron en los extractos generados en un medio de cultivo con almidón y disminuyeron en un medio de cultivo con glicerol.

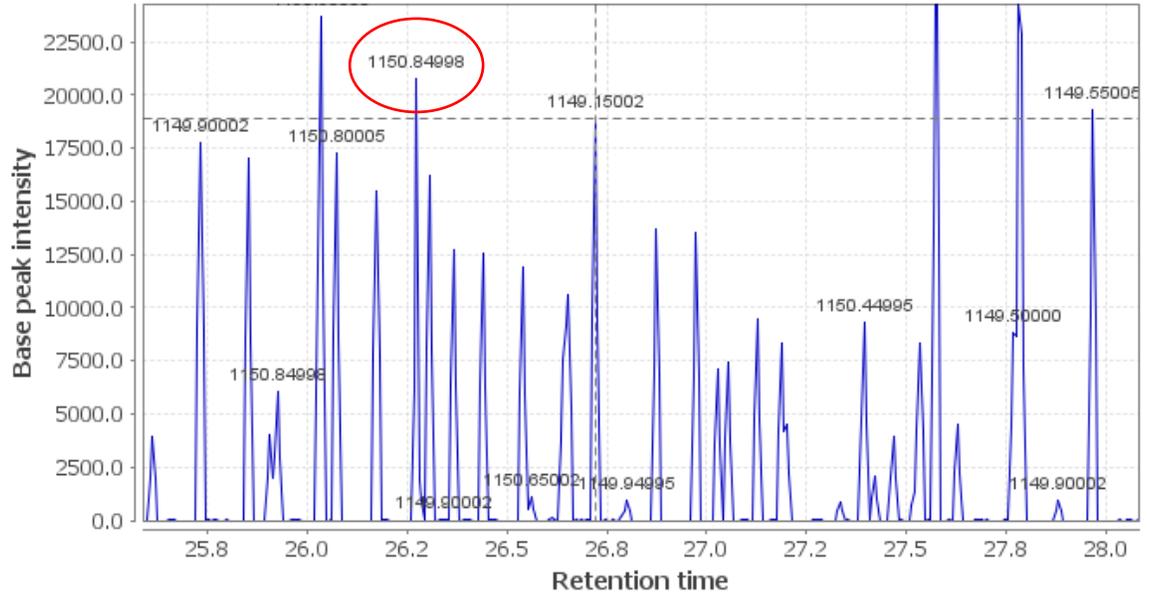


Figura 20. Cromatograma del extracto crudo con capacidad antioxidante (*G. hongkongensis* Z9.2D8).

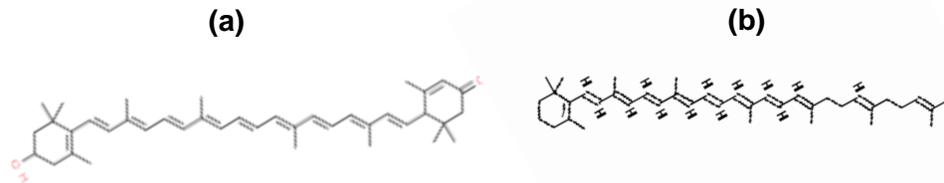


Figura 21. Estructura de (a) 3-Hidroxi-b,e-caroten-3'-ona (C₄₀H₅₄O₂) (b) 1,2-Dihidrolícopeno (C₄₀H₅₈).

El cromatograma del extracto crudo con presencia de pigmento y capacidad antioxidante de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 también fue objeto de análisis (Figura 22). En este, se identificó un pico en 1094.94 m/z con una intensidad de 15812 y un tiempo de retención de 27 (área: 20968). Este pico, al ser consultado en la base de datos de CEUMASS web, mostró similitud con los aductos 2M+NH₄, y el compuesto M correspondiente a 1,2-Dihidrolícopeno (C₄₀H₅₈) (Figura 21b), el cual pertenece a la familia de los carotenoides.

Se infiere que este compuesto es el responsable tanto de la pigmentación como de la actividad antioxidante observada en el extracto.

Es importante mencionar que este pico presentó un aumento en la intensidad cuando el metabolito pigmentado con actividad antioxidante se produjo en un medio de cultivo con sacarosa como fuente de carbono (intensidad: 23018), pero disminuyó (intensidad: 8968) cuando se intentó producir el metabolito de interés en un medio de cultivo con glicerol como fuente de carbono. Este hallazgo respalda la relación entre la actividad antioxidante y la absorbancia, ya que ambos aumentaron en los extractos generados en un medio de cultivo con sacarosa y disminuyeron en un medio de cultivo con glicerol.

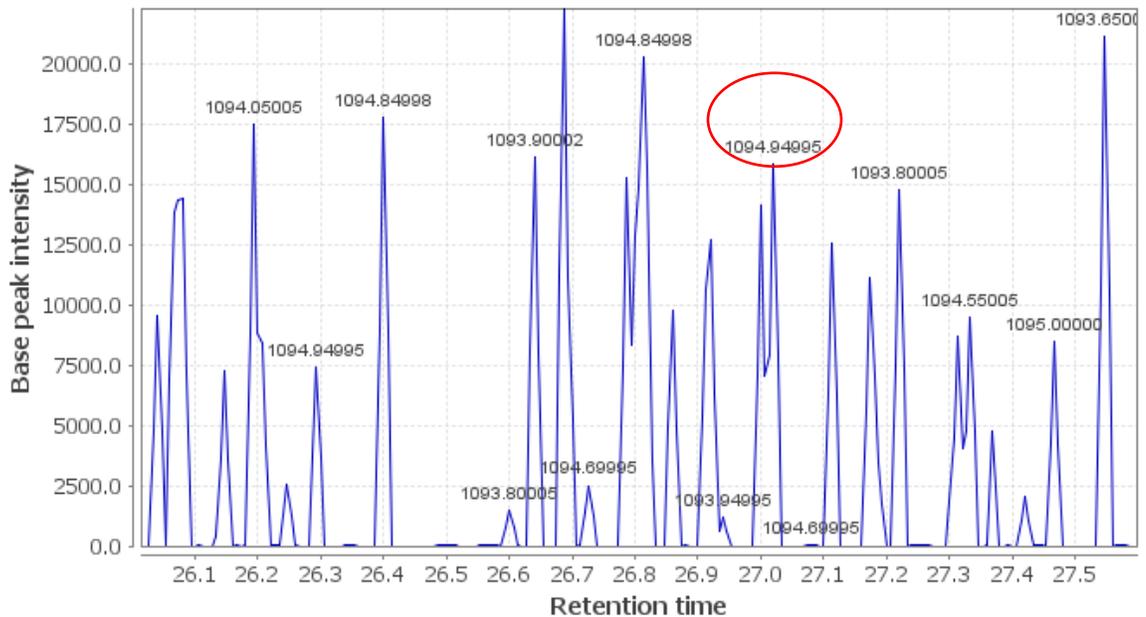


Figura 22. Cromatograma del extracto crudo con actividad antioxidante (cepa *G. hongkongensis* G11.1D5).

El Betacaroteno (B-caroteno) y el licopeno son carotenoides liposolubles, de coloración naranja y roja, con diversas propiedades químicas, dentro de las cuales resalta su capacidad para interactuar y neutralizar las especies reactivas del oxígeno (ROS), confiriéndole a estas sustancias altos niveles de actividad antioxidante (Fernandes et al., 2018). Estas afirmaciones permiten sustentar el hecho de que los extractos crudos con actividad antioxidante posean coloración naranja y alto porcentaje de actividad antioxidante, en especial, mejores valores para la actividad de captura de radicales ABTS, ya que esta cuantifica las sustancias liposolubles. Cabe resaltar que en la literatura se han encontrado otros carotenoides con longitudes de onda de máxima absorción similares a encontradas en los extractos de las cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5). Por ejemplo, el carotenoide extraído por Shatila et al., 2013 presentó una absorbancia máxima a 460nm, Varsha & Arpana (2013) informaron de que carotenoides producidos a partir de *Planococcus maritimus* AHJ 2 absorbían la luz en el visible de 466 nm y Sasidharan et al. (2013) mencionaron que la mayoría de los carotenoides absorben la luz máxima en la longitud de onda con un hombro ancho a 467 nm (Jaber et al., 2022). et al., 2022).

Cabe resaltar que otros tipos de carotenoides producidos por la especie *Gordonia*, ya han sido reportados. (Loh et al., 2020) informó sobre una equinenona producida por *Gordonia*

terrae TWRH01 (analizado mediante GC-MS), (Jeon et al., 2012)) habló del rol metabólico de un carotenoide producido por *Gordonia alkanivorans SKF12010* y (Fernandes et al., 2018) estudió la importancia de las condiciones de cultivo en la producción de carotenoides a partir de *Gordonia alkanivorans 1B*.

La información anterior permite inferir que los carotenoides bacterianos han surgido como una fuente prometedora para el uso industrial debido a la variación de los tonos de color y a la menor necesidad de medios. Sin embargo, el coste de producción de los carotenoides bacterianos sigue siendo considerablemente superior al de las fuentes sintéticas, lo que dificulta sus aplicaciones comerciales (Ram et al. 2020), razón por la cual, es necesario continuar en el estudio de la mejora de estrategias de producción de las bacterias productoras de carotenoides existentes y la exploración continua de nuevos carotenoides que permitan mejorar los rendimientos y, posteriormente, reduzcan el precio de venta de los carotenoides (Chee et al., 2022).

Las Tablas S15 y S16 contienen la información de los posibles metabolitos atribuibles a los otros picos encontrados en el cromatograma del extracto crudo con presencia de pigmento y actividad antioxidante de las cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5). El grado de relación estructural entre los isómeros de los compuestos identificados en el nivel 4 según lo establecido por Schymanski et al., 2014. Es importante resaltar que entre las sustancias identificadas parcialmente, en ambos extractos, se presentó una posible semejanza del 90% y muchas de estas no han sido reportadas en la literatura como responsables de producción de pigmentos o de capacidad antioxidante. Sin embargo, algunas de estas sustancias presentan bioactividades interesantes como la fosfinotricina, la cual, es un importante herbicida de amplio espectro, cada vez más utilizado en la actualidad, debido a que es inocuo para el medio ambiente (Kang et al., 2019), la 4-aminopiridina es un bloqueante de los canales de potasio utilizado para mejorar el estado de salud de pacientes con esclerosis múltiple (Caggiano et al., 2013), la salicifolina ha sido probada con actividad de reversión de la resistencia a múltiples fármacos (MDR) en células de linfoma de ratón (Chacón-Morales, 2022); el Laurinterol ha sido reportado con buena actividad antimicobacteriana, especialmente frente a micobacterias no tuberculosas (García-Davis et al., 2020), el cetilpiridinio es uno de los antisépticos más utilizados en productos de cuidado bucal con buena actividad antimicrobiana frente a biopelículas (Mao et al., 2020), La capsaicina, el principal ingrediente activo del chile, ha sido reportada como agente preventivo del cáncer (Zhang et al., 2020), el triptófano es un aminoácido esencial para el organismo de los seres humanos necesario para producir proteínas, enzimas y neurotransmisores, está presente en alimentos y suplementos (Badawy, 2018) y la atorvastatina, ampliamente utilizada como medicamento para disminuir el colesterol en la sangre, prevenir accidentes cerebrovasculares, infartos al miocardio y angina de pecho (Ali et al., 2019).

Como se mencionó anteriormente, la posible similitud entre los compuestos encontrados fue del 90%, sin embargo, las sustancias señaladas como responsables de la actividad antioxidante y la producción de pigmento fueron diferentes en cada extracto, aunque, ambas fueron clasificadas como carotenoides. Lo anterior puede deberse al hecho de que como se comentó en secciones previas, aunque ambas cepas fueron clasificadas dentro de la misma especie, fueron aisladas de lugares diferentes (la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 fue aislada de una esponja, mientras que la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 de un octocoral), lo cual representa una característica crítica en el desarrollo del sofisticado metabolismo especializado y constituye un indicador del éxito adaptativo y, por tanto, de la

plasticidad de su genotipo. Esta diversidad de nichos ecológicos y adaptaciones también han sido reconocidas en el género *Gordonia*. Este, según estudios posee un pan-genoma estimado en 57.901 genes (altamente relacionados con el metabolismo y el procesamiento de proteínas), los cuales, son más homogéneos dentro de cada especie. Sin embargo, algunos solo se encuentran en algunas cepas dentro de cada especie (Sánchez-Suárez, Díaz, Coy-Barrera, et al., 2022). Lo cual es un indicio de las ligeras o grandes diferencias en las condiciones de cultivo de varias cepas de una misma especie de *actinobacterias* pueden producir cambios metabólicos. Cabe resaltar que la identificación de las posibles sustancias responsables de las bioactividades es una aproximación, ya que no se llevó a cabo una identificación completa de todas las sustancias presentes en los extractos crudos de las cepas de *G. hongkongensis*.

CAPÍTULO 3.3. POTENCIAL DE INHIBICIÓN DE ENZIMAS CAUSANTES DE ENVEJECIMIENTO PREMATURO

El envejecimiento de la piel es uno de los procesos más significativos que los cosméticos intentan abordar. Los cambios más notables son la sequedad cutánea, la disminución de la elasticidad, las arrugas finas y los cambios de la piel que dan lugar a líneas de expresión. La inhibición de enzimas como la hialuronidasa y la colagenasa son objetivos para los nuevos productos relacionados con la aplicación antienvjecimiento (Samy et al., 2019).

Se evaluó el potencial cosmético de los extractos crudos presencia de pigmento y capacidad antioxidante de las cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5) mediante la medición de su capacidad para inhibir las enzimas colagenasa y hialuronidasa, tanto en los extractos originales (producidos en medio GYM) como en los extractos optimizados.

3.3.1. Potencial de inhibición de la enzima hialuronidasa:

Los extractos analizados de las cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5) mostraron ser capaces de inhibir la reacción de la enzima hialuronidasa, como se muestra en la Figura 23.

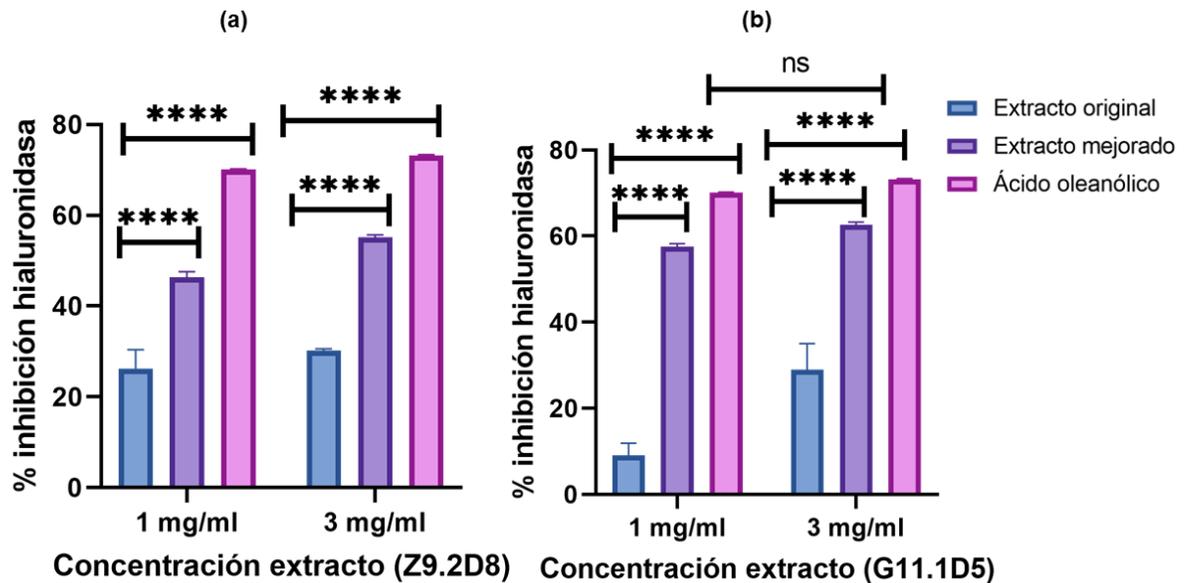


Figura 23. Potencial de inhibición de la enzima hialuronidasa de los extractos crudos con presencia de pigmento y capacidad antioxidante de las cepas de *Gordonia hongkongensis* (a) Z9.2D8 y (b) G11.1D5. Cultivadas en medio GYM.

El extracto original se refiere al obtenido a partir del medio de aislamiento de cada cepa y el extracto mejorado hace referencia al obtenido a partir de las condiciones de maximización de la absorbancia (producción de pigmento) y la capacidad de secuestro de radicales ABTS y DPPH.

En el caso de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8, se observó un aumento estadísticamente significativo en la capacidad de inhibición de la enzima hialuronidasa cuando se utilizó el extracto mejorado, con valores del 54.69% a una concentración de 3 mg/mL y 47.57% a 1 mg/mL, en comparación con el extracto original que mostraba una capacidad inhibitoria de la enzima hialuronidasa del 30.41% (3 mg/mL) y 26.23% (1 mg/mL). Es importante destacar que el extracto mejorado presentó diferencias significativas entre las dos concentraciones analizadas, lo que sugiere un aumento sustancial en la concentración de la sustancia responsable de la bioactividad. Este comportamiento no se observó en el análisis del extracto original. La cinética de inhibición de la enzima hialuronidasa en el tiempo (Figura 24) respalda los datos anteriores y muestra que el ácido oleanólico es la sustancia más eficiente para inhibir la reacción enzimática, seguido del extracto mejorado, el extracto original y, por último, el blanco, que no presenta ninguna inhibición de la reacción enzimática.

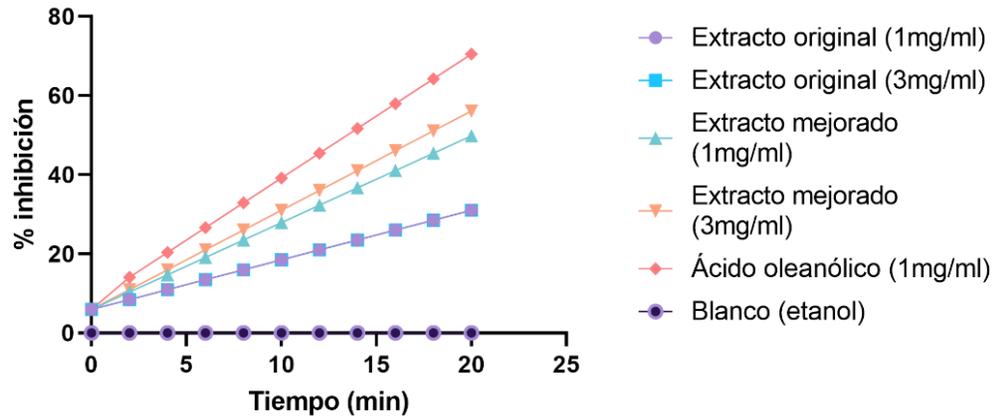


Figura 24. Cinética de inhibición de la enzima hialuronidasa de los extractos crudos con presencia de pigmento y capacidad antioxidante de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8.

La cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 también demostró que sus extractos tienen la capacidad de inhibir la enzima hialuronidasa tanto en el extracto original (1 mg/mL: 9.10% y 3 mg/mL: 25.62%) como en el extracto mejorado (1 mg/mL: 58.21% y 3 mg/mL: 62.59%). Es importante destacar que el extracto mejorado, en ambas concentraciones, no mostró diferencias significativas ($p=0.99$) en la inhibición enzimática en comparación con el ácido oleanólico a 1 mg/mL (70.21%). La cinética de inhibición de la enzima hialuronidasa, como se muestra en la Figura 25, respalda los resultados anteriores, con los mejores valores de inhibición observados en el ácido oleanólico (control positivo) y el extracto mejorado, seguidos del extracto original y, por último, el blanco (reacción enzimática de degradación del colágeno).

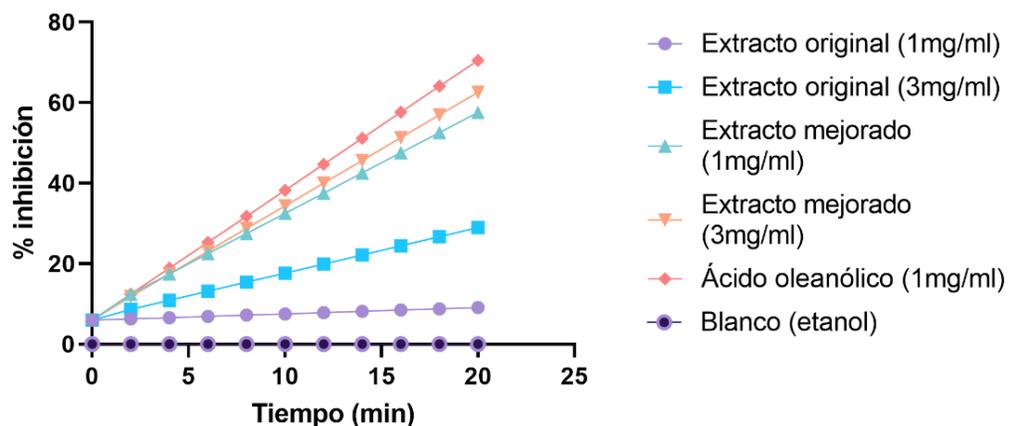


Figura 25. Cinética de inhibición de la enzima hialuronidasa de los extractos crudos con presencia de pigmento y con actividad antioxidante de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5.

3.3.2. Potencial de inhibición de la enzima colagenasa:

Todos los extractos analizados para ambas cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5) mostraron valores de inhibición de la enzima colagenasa directamente proporcional con la concentración del extracto, sin embargo, estos no presentaron diferencias estadísticas significativas (Figura S15). Concretamente, el extracto mejorado de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 mostró la mayor inhibición de la citada enzima con un 28.25% a una concentración de 3mg/mL y de 27.79% a 1mg/mL, superando significativamente el potencial de inhibición del extracto original, el cual presentó valores de 17.01% (3mg/mL) y 14.58% (1mg/mL). Estos resultados se ven corroborados con la cinética de inhibición de la colagenasa (Figura 26), en la cual se muestra una mayor inhibición de la enzima en el tiempo por parte del ácido oleanólico (Control positivo), seguido del extracto mejorado, el extracto original y finalmente, el blanco (reacción enzimática de degradación del colágeno).

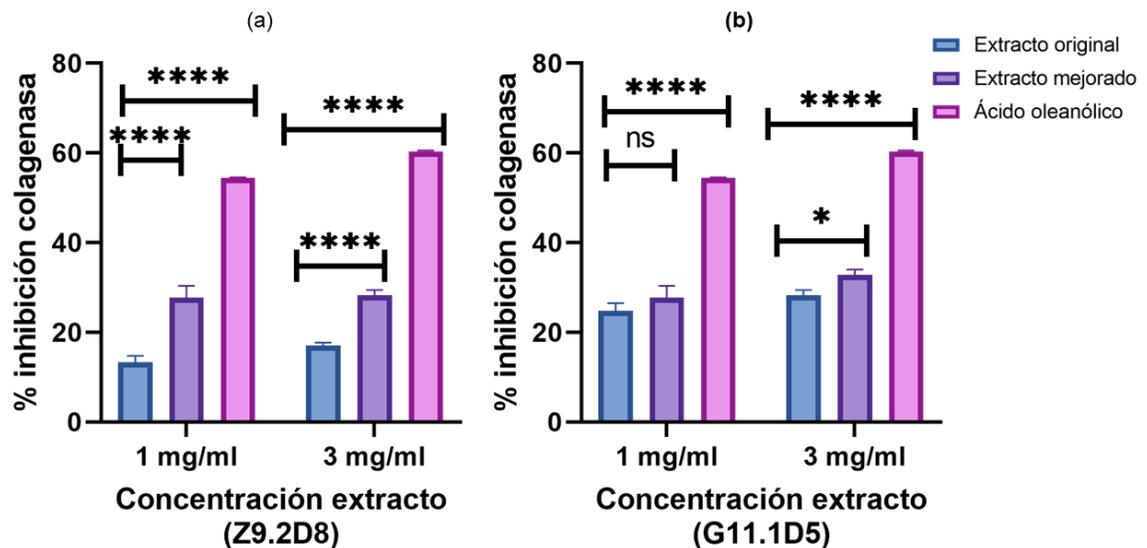


Figura 26. Potencial de inhibición de la enzima colagenasa de los extractos crudos con presencia de pigmento y actividad antioxidante de las cepas de *Gordonia hongkongensis*. (a) Z9.2D8 y (b) G11.1D5. Cultivadas en medio GYM.

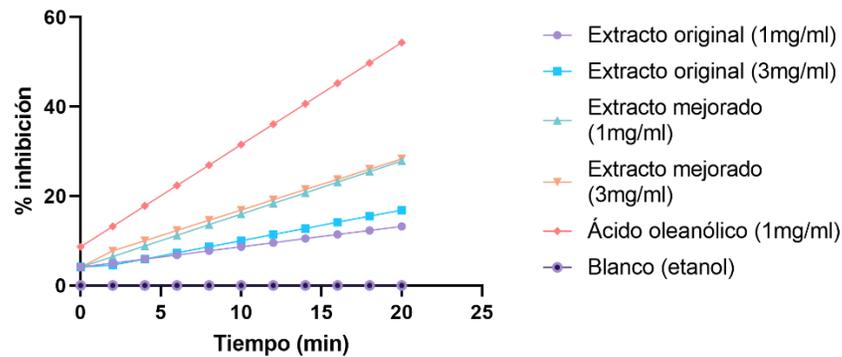


Figura 27. Cinética de inhibición de la enzima collagenasa de los extractos crudos con presencia de pigmento y capacidad antioxidante de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM.

Además, en la Figura 28, se observa un comportamiento de inhibición de la collagenasa por parte del extracto crudo de *G. hongkongensis* G11.1D5, que se asemeja al de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8. El extracto mejorado exhibe la inhibición más destacada de la enzima, alcanzando un valor del 34.18% a una concentración de 3 mg/mL y del 25.52% a 1 mg/mL. Estos valores superan la capacidad de inhibición del extracto original, que era del 29.62% a 3 mg/mL y del 23.52% a 1 mg/mL. La cinética de inhibición de esta cepa muestra resultados superiores al ácido oleanólico (control positivo), seguido por el extracto mejorado, el extracto original y, por último, el blanco (reacción enzimática de degradación del colágeno), como se ilustra en la Figura 28.

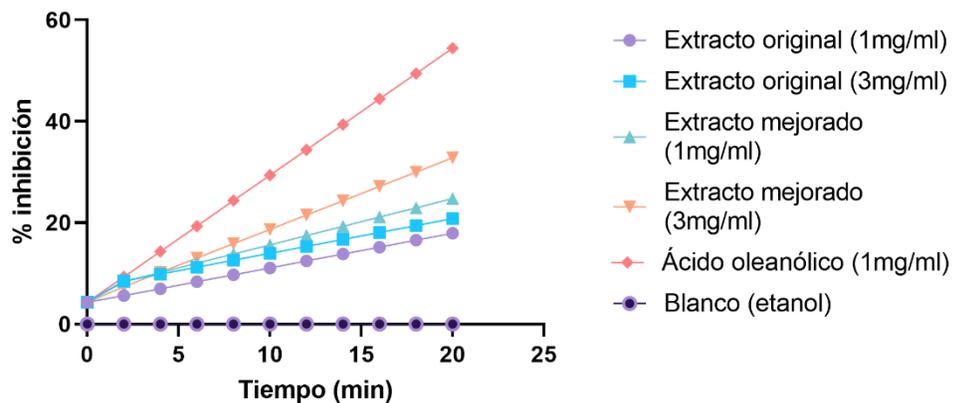


Figura 28. Cinética de inhibición de la enzima collagenasa de los extractos crudos con presencia de pigmento y capacidad antioxidante de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5, cultivada en medio GYM.

El extracto original se refiere al obtenido a partir del medio de aislamiento de cada cepa y el extracto mejorado hace referencia al obtenido a partir de las condiciones de maximización de la absorbancia (producción de pigmento) y la capacidad de captura de radicales ABTS y DPPH.

La capacidad de inhibición observada en los extractos crudos derivados de los cultivos de las cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5) se atribuye principalmente a su contenido de carotenoides, como se detalla en la sección 3.2. Estas sustancias son reconocidas por sus destacadas propiedades antioxidantes y antienvjecimiento en la literatura científica. No obstante, es importante señalar que la exploración del efecto antienvjecimiento a través de la inhibición de las enzimas colagenasa y hialuronidasa ha sido un área de investigación relativamente poco explorada hasta el momento.

Algunos autores, como Pagels et al. (2022), han examinado la presencia de carotenoides en extractos de *cianobacterias* (*Cyanobium sp.*) y han evaluado su capacidad de inhibición enzimática. Sus resultados revelaron que el extracto etanólico fue capaz de inhibir la hialuronidasa con una IC50 de $108.74 \pm 5,74 \mu\text{g/ml}$, mientras que el extracto acuoso de dichos carotenoides demostró la capacidad de inhibir tanto la hialuronidasa como la colagenasa, con IC50 de $67.25 \pm 1,18 \mu\text{g/ml}$ y $582.82 \pm 56.9 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. En contraste con lo anterior, la presente investigación encontró que ambas cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5) inhiben tanto la colagenasa como la hialuronidasa con un IC50 de $1.5 \pm 1.1 \text{ mg/ml}$. Estos hallazgos sugieren que los extractos de interés podrían tener aplicaciones prometedoras en la industria cosmecéutica, particularmente en productos tópicos diseñados para mejorar la pigmentación, prevenir la formación de radicales libres y ralentizar el proceso de envejecimiento de la piel.

CONCLUSIONES

El proceso de optimización de la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes de dos cepas marinas de *Gordonia hongkongensis* fue exitoso, puesto que condujo a una combinación de condiciones de cultivo, las cuales permitieron obtener un incremento significativo en la producción de pigmento, con aumentos superiores a 0.22 unidades de absorbancia y mejoras de más del 25% en la capacidad de secuestro de radicales libres tanto para ABTS como para DPPH, en ambas cepas. Este hallazgo representa un avance significativo en el campo de la biotecnología marina, los incrementos notables en la producción de pigmentos y capacidad antioxidante demuestran la eficacia de esta metodología, lo que contribuye al conocimiento científico en el área de la producción de compuestos bioactivos y abre la posibilidad de considerar la fermentación de *actinobacterias* marinas, como las *Gordonias*, como un método no perjudicial para la salud humana y el medio ambiente en la obtención de carotenoides.

Los modelos validados para cada una de las variables de respuesta en las cepas de *Gordonia hongkongensis* estudiadas mostraron diferencias inferiores al 10%. Esto indica que son capaces de predecir con precisión el comportamiento de la producción de pigmentos y la capacidad antioxidante en el espacio experimental seleccionado. Este nivel de exactitud proporciona un conocimiento detallado y confiable sobre el comportamiento de las cepas de *Gordonia hongkongensis* (Z9.2D8 y G11.1D5) bajo diversas combinaciones de condiciones de cultivo. Además, abre la posibilidad de una futura implementación a nivel industrial, sugiriendo que el proceso podría ser escalable con confianza y eficacia, permitiendo optimizar también el rendimiento de extracción, el cual, en condiciones óptimas mostró un valor de 0.9 mg extracto/g biomasa y 0.7 mg extracto/g biomasa, para las cepas *hongkongensis* Z9.2D8 y *hongkongensis* G11.1D5, respectivamente. Estas cifras indican

una viabilidad técnica y económica prometedora para ampliar el proceso a una escala mayor. Esto permitiría una evaluación más precisa y definida de la viabilidad de una expansión industrial, considerando la posible variabilidad del proceso biotecnológico actual en función del volumen de cultivo.

En el proceso de identificación tentativa de los componentes responsables de las bioactividades, en los extractos de las cepas estudiadas, se observó que la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 presentó similitud con los aductos 2M+NH₄, correspondientes a la 3-Hidroxi-b,e-caroten-3'-ona (C₄₀H₅₄O₂). Por otro lado, la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5 exhibió similitud con los aductos 2M+NH₄, asociados al 1,2-Dihidrocopeno (C₄₀H₅₈). Estas sustancias pertenecen a la familia de los carotenoides y son reconocidas por su destacada capacidad antioxidante y su eficacia en la inhibición de enzimas cosméticas como la hialuronidasa y la colagenasa. Este hallazgo brinda una comprensión más profunda de los mecanismos detrás de las bioactividades observadas, que podría conducir a futuras investigaciones y aplicaciones más específicas en el campo de la salud y la cosmética.

Finalmente, se demostró que los extractos etanólicos crudos de las cepas *G. hongkongensis* G11.1D5 y *G. hongkongensis* Z9.2D8 poseen una notable capacidad de inhibir dos de las principales enzimas responsables del envejecimiento, con un máximo de inhibición de la enzima colagenasa del 28.25% y 34.18% para la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5, respectivamente. Además, estos extractos también exhibieron capacidad inhibitoria de la enzima hialuronidasa, con un máximo de 54.69% y 62.59% para la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8 y *G. hongkongensis* G11.1D5, respectivamente. Todo esto lleva a considerar este extracto como un aditivo ideal para productos cosmeceúticos, especialmente en aquellos destinados a la pigmentación, la prevención del estrés oxidativo y el retraso del envejecimiento de la piel. Lo que podría tener un impacto económico y científico significativo, en la industria de la belleza y la salud.

En conjunto, esta investigación no solo permite avanzar en la comprensión científica, sino que también tienen el potencial de influir en la práctica y la industria, ofreciendo alternativas más sostenibles y eficaces en la producción de compuestos beneficiosos para la salud y la belleza. Abriendo la posibilidad de investigación sobre producción de metabolitos bioactivos en especies de *actinobacterias* poco estudiadas como las *Gordonias* marinas.

CAPÍTULO 4. OBSERVACIONES FINALES

Los estudios derivados de esta tesis que complementarían los resultados reportados serían:

- Proceso de separación y refinación de los compuestos bioactivos encontrados en los extractos crudos con presencia de pigmento y con capacidad antioxidante de las cepas *G. hongkongensis* Z9.2D8 y/o *G. hongkongensis* G11.1D5.
- Evaluar el efecto de la luz, el pH, la temperatura y otros factores en la conservación del color y de las bioactividades.
- Escalamiento de la producción de los extractos crudos provenientes de los cultivos de *G. hongkongensis* Z9.2D8 y/o *G. hongkongensis* G11.1D5.
- Estudio de estabilidad y posible uso en una formulación cosmeceutica de los extractos crudos presencia de pigmento y capacidad antioxidante de las cepas *G. hongkongensis* Z9.2D8 y/o *G. hongkongensis* G11.1D5.

- Llevar a cabo estudios *in vivo* que validen la eficacia y funcionalidad de los pigmentos y compuestos antioxidantes de los extractos provenientes de de las cepas *G. hongkongensis* Z9.2D8 y/o *G. hongkongensis* G11.1D5.

REFERENCIAS

- Abraham, J., & Chauhan, R. (2018). Profiling of red pigment produced by *Streptomyces* sp. JAR6 and its bioactivity. *3 Biotech*, *8*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1044-7>
- Agilent. (2016). *Fundamentos de Espectroscopia Molecular: Hardware*.
- Alcalde, M. (2007). Alimentos usados en formulación cosmética. In *Ámbito Farmacéutico. Cosmética* (Vol. 26, Issue 3, pp. 100–109). [http://dica.minec.gob.sv/inventa/attachments/article/7639/Alimentos y cosmética.pdf](http://dica.minec.gob.sv/inventa/attachments/article/7639/Alimentos%20y%20cosm%C3%A9tica.pdf)
- Ali, I., Alharbi, O. M. L., AlOthman, Z. A., Alwarthan, A., & Al-Mohaimed, A. M. (2019). Preparation of a carboxymethylcellulose-iron composite for uptake of atorvastatin in water. *International Journal of Biological Macromolecules*, *132*, 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.211>
- Alves, L., & Paixão, S. M. (2014). Fructophilic behaviour of *Gordonia alkanivorans* strain 1B during dibenzothiophene desulfurization process. *New Biotechnology*, *31*(1), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.08.007>
- Amores, C. C., José, P., & Benavides, H. (2018). Activos antioxidantes en la formulación de productos cosméticos anti- envejecimiento. *Ars Pharm*, *59*(2), 77–84. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.30827/ars.v59i2.7218>
- Anggraini, N. B., Elya, B., & Iskandarsyah, I. (2021). Antielastase Activity of Macassar Kernels (*Rhus javanica*) Stem Extract and Skin Elasticity Evaluation of Its Topical Gel Formulation. *Hindawi*, *2021*, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2021/6690029>
- Ayala, M. E. (2015). Análisis de competitividad internacional del sector cosméticos e ingredientes naturales. In *Programa de calidad para el sector cosméticos- Safe* (Vol. 53, Issue 9).
- Badawy, A. A. B. (2018). Hypothesis kynurenic and quinolinic acids: The main players of the kynurenine pathway and opponents in inflammatory disease. *Medical Hypotheses*, *118*, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.06.021>
- Barczynska, R., Katarzyna Slizewska, Mieczyslaw Litwin, Mieczyslaw Szalecki, Arkadiusz Zarski, & Janusz Kapusniak. (2015). The effect of dietary fibre preparations from potato starch on the growth and activity of bacterial strains belonging to the phyla Firmicutes, Bacteroidetes, and Actinobacterias. *Journal of Functional Foods*.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H., Clément, C., Ouhdouch, Y., & Wezel, P. Van. (2016). *Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria*. *80*(1), 1–44. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15.Address>

- Betancor, L., Gadea, M., & Flores, K. (2021). Genética bacteriana. In *La Semana médica* (Vol. 112, Issue 26, pp. 59–80).
- Beygmoradi, A., & Homaei, A. (2018). Marine chitinolytic enzymes , a biotechnological treasure hidden in the ocean ? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 9937–9948. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-018-9385->
- Bravo, K., & Pereañez, J. A. (2016). Colombian biodiversity, an opportunity for the strengthening of the pharmaceutical and cosmetic industries. *Vitae*, 23(3), 163–165. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v23n3a01>
- Caggiano, A., Blight, A., & Parry, T. J. (2013). Identification of metabolites of dalfampridine (4-aminopyridine) in dog and rat. *Journal of Drug Assessment*, 2(1), 72–80. <https://doi.org/10.3109/21556660.2013.794143>
- Caycedo Lozano, L., Corrales Ramírez, L. C., & Trujillo Suárez, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Chacón-Morales, P. A. (2022). Unprecedented diterpene skeletons isolated from vascular plants in the last twenty years (2001–2021). In *Phytochemistry* (Vol. 204). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113425>
- Chandra, P., Sharma, R. K., & Arora, D. S. (2020). Antioxidant compounds from microbial sources: A review. *Food Research International*, 129(July 2019), 108849. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108849>
- Cheema, M. T., Ponomareva, L. V, Liu, T., Voss, S. R., Thorson, J. S., Shaaban, K. A., & Sajid, I. (2021). Taxonomic and Metabolomics Profiling of Actinobacteria Strains from Himalayan Collection Sites in Pakistan. *Current Microbiology*, 78(8), 3044–3057. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02557-y>
- Choksi, J., Vora, J., & Shrivastava, N. (2020). Bioactive Pigments from Isolated Bacteria and Its Antibacterial , Antioxidant and Sun Protective Application Useful for Cosmetic Products. *Indian J Microbiol* , 60(3), 379–382. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12088-020-00870-x>
- Corrales Ramírez, L. C., & Caycedo Lozano, L. (2020). Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología Principios físicoquímicos de los colorantes. *Nova*, 18(33). <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>
- Cruz-bautista, R., Manzo-ruiz, M., Passari, A. K., & Rodr, R. (2022). *Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation , an old but not well-established regulatory system*. 15, 1058–1072. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13791>
- De Oliveira, T. H. B., De Gusmao, N. B., Da Silva, L. A. O., & Coelho, L. C. B. B. (2021). Free radicals and actinobacteria as a misexplored goldmine of antioxidant compounds. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 93, 1–23. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201925>
- Devivilla, S., Stephen, J., Lekshmi, M., Kumar, S. H., & Nayak, B. B. (2019). Evaluation of modified Zobell marine agar for differential isolation of histamine-forming bacteria from

- fresh fish. *Journal of Microbiological Methods*, 163. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105649>
- El-Naggar, N. E. A., Moawad, H., El-Shweihy, N. M., & El-Ewasy, S. M. (2015). Optimization of culture conditions for production of the anti-leukemic glutaminase free L-asparaginase by newly isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 using response surface methodology. *BioMed Research International*, 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/627031>
- Ezquerro-brauer, J. M., & Chan-higuera, J. E. (2021). Capacidad antioxidante y mecanismo de acción de pigmentos en organismos marinos Antioxidant capacity and mechanism of action of pigments in marine organisms. *Biotecnología y Ciencias Agropecuarias*, 15(2), 186–197. <https://doi.org/https://doi.org/10.29059/cienciauat.v15i2.1501>
- Fatemeh Mollaamin, & Majid Monajjemi. (2020). Thermodynamic and IR Spectral Study of Metal Cations–Anthocyanin Chelation: Mechanism of Formation of Pigments. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 94(9), 1887–1901. <https://doi.org/10.1134/S0036024420090204>
- Fernandes, A. S., Paixão, S. M., Silva, T. P., & Roseiro, J. C. (2018). Influence of culture conditions towards optimal carotenoid production by *Gordonia alkanivorans* strain 1B. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(2), 143–155. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1853-4>
- García-Davis, S., Leal-López, K., Molina-Torres, C. A., Vera-Cabrera, L., Díaz-Marrero, A. R., Fernández, J. J., Carranza-Rosales, P., & Viveros-Valdez, E. (2020). Antimycobacterial activity of laurinterol and aplysin from *Laurencia johnstonii*. *Marine Drugs*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/md18060287>
- Ghattavi, K., Homaei, A., Kamrani, E., & Kim, S. (2022). Dyes and Pigments Melanin pigment derived from marine organisms and its industrial applications. *Dyes and Pigments*, 201(February), 110214. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110214>
- Hakobyan, L., Gabrielyan, L., & Trchounian, A. (2012). Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides* strains from mineral springs. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(8), 6519–6526. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.077>
- Jaber, B. A., Majeed, K. R., & Al-hashimi, A. G. (2022). Isolation and Identification of New Strains of Bacteria Producing Carotenoids Pigments which Isolated from a Different Sources in Basrah, Iraq. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 35(1), 82–93. <https://doi.org/https://doi.org/10.37077/25200860.2022.35.1.07>
- Jácome Roca, A. (2017). Historia de los Medicamentos. In *Medicina* (Vol. 3, Issue 3).
- Jeon, B. Y., Kim, B. Y., Jung, I. L., & Park, D. H. (2012). Metabolic roles of carotenoid produced by non-photosynthetic bacterium *Gordonia alkanivorans* SKF120101. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(11), 1471–1477. <https://doi.org/10.4014/jmb.1207.07038>
- Kang, X. M., Cai, X., Liu, Z. Q., & Zheng, Y. G. (2019). Identification and characterization of an amidase from *Leclercia adecarboxylata* for efficient biosynthesis of L-

- phosphinothricin. *Bioresource Technology*, 289. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121658>
- Kumar Patra, J., Shukla, A. C., & Das, G. (2020). Advances in pharmaceutical biotechnology: Recent progress and future applications. In *Advances in Pharmaceutical Biotechnology: Recent Progress and Future Applications*. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2195-9_14
- Kumar, S., Kumar, V., Nag, D., Kumar, V., Darnal, S., Thakur, V., & Patial, V. (2022). Microbial pigments : learning from the Himalayan Pigment Producing Microorganisms : The. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jimb/kuac017>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Loh, W. L. C., Huang, K. C., Ng, H. S., & Lan, J. C. W. (2020). Exploring the fermentation characteristics of a newly isolated marine bacteria strain, *Gordonia terrae* TWRH01 for carotenoids production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 130(2), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.03.007>
- Mao, X., Auer, D. L., Buchalla, W., Hiller, K.-A., Maisch, T., Hellwig, E., Al-Ahmad, A., & Cieplik, F. (2020). Cetylpyridinium Chloride: Mechanism of Action, Antimicrobial Efficacy in Biofilms, and Potential Risks of Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(8), 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AAC.00576-20>
- Marcano, D. (2018). Introducción a la Química de los Colorantes. In *Colección Divulgación Científica y Tecnológica*.
- Mariano Matías, A. (2009). *Herramientas para el mejoramiento genético de S . violaceusniger YCED-9 enfocadas a la producción de metabolitos secundarios*.
- Melo Saca, M. J. (2019). *Marcha fitoquímica, contenido de fenoles totales y propiedades antioxidante, anti-elastasa y anti-colagenasa de extractos etanólicos de microalgas del litoral Peruano*.
- Mendoza Isaza, N. A., Hoyos–Arbeláez, J. A., & Peláez-Jaramillo, C. A. (2020). Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales de extractos de tallo de *Stevia rebaudiana* en varios modelos in vitro. *Revista EIA*, 17(34), 1–9. <https://doi.org/10.24050/reia.v17i34.1282>
- Ministerio de medio ambiente, & Humboldt, I. (1995). *Política Nacional de Biodiversidad (PNB)*. 1–34.
- Mohamedin, A. H., El-Naggar, N. E. A., Sherief, A. E. D. A., & Hussien, S. M. (2015). Optimization of bioactive metabolites production by a newly isolated marine *Streptomyces* sp. using statistical approach. *Biotechnology*, 14(5), 211–224. <https://doi.org/10.3923/biotech.2015.211.224>
- Mohammadipanah, F., & Momenilandi, M. (2018). Potential of rare actinomycetes in the production of metabolites against multiple oxidant agents. *Pharmaceutical Biology*, 56(1), 51–59. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1417451>

- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., & Schäffer, A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, *24*(16), 1757–1764. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn322>
- Morones Ramírez, J. R., Alvarado Martínez, V., Flores Rocha, O. L., Villareal Chiu, J. F., Cantú Cárdenas, M. E., & Menchaca López, D. N. (2015). Colorantes y pigmentos microbianos en la belleza cosmética. *Revista Digital Universitaria UNAM*, *16*(abril), 1607–6079.
- Musleh, S. S., Gomez-Uchida, D., Espinoza, C., Ruiz-Tagle, N., Fonseca, A., & Gallardo, V. A. (2016). Taxonomía molecular y dinámica comunitaria de Actinobacteria en sedimentos marinos de Chile central. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, *51*(1), 89–100. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000100009>
- Ortega-Cabello, L., Pérez-Méndez, H. I., Manjarrez-Alvarez, N., Solís-Oba, A., & López-Luna, A. (2017). Effect of iron salts on *Rhodococcus* sp. and *Gordonia* sp. On carotenoid production. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *16*(1), 1–10.
- Pérez, J. P., Comas, L. V., & Ramos, P. P. (2017). Diseño y desarrollo de dos mascarillas faciales para el acné con quitina como sustancia bioactiva. *Revista Cubana de Farmacia*, *45*(2), 251–263.
- R, B., Gradstein, S. R., & Celis., M. (2015). Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. *Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia*, 2015. http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/es/resultados/especie/Ugni_myricoides/
- Rakesh, K. N., Junaid, S., Dileep, N., & R, P. K. T. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of streptomycetes species SRDP-H03 isolated from soil of Hosudi, Karnataka, India. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, *3*(4), 47–53.
- Ramirez-Rodriguez, L., Stepanian-Martinez, B., Morales-Gonzalez, M., & Diaz, L. (2018). Optimization of the cytotoxic activity of three streptomycetes strains isolated from guaviare river sediments (Colombia, South America). *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2839356>
- Saintemarie, A., & Matic, N. (2015). *The Global Natural and Organic Cosmetics Market*. 224–233.
- Samy, M. N., Go, L., Lopes, P., Georgousaki, K., Gumeni, S., Almeida, C., Gonz, I., Genilloud, O., Trougakos, I., Fokialakis, N., & Ouazzani, J. (2019). Osmanicin, a Polyketide Alkaloid Isolated from *Streptomyces osmaniensis* CA-244599 Inhibits Elastase in Human Fibroblasts. *MDPI*, *24*(2239), 1–13. <https://doi.org/doi:10.3390/molecules24122239>
- San Andrés, M., Sancho, N., & de la Roja, J. M. (2010). Historia de la Química Alquimia : Pigmentos y colorantes históricos. *Real Sociedad Española de Química*, *106*(1), 58–65.
- Sánchez-Suárez, J., Díaz, L., & Villamil, L. (2022). *Contribution to the bioprospecting of actinomycetes associated with marine invertebrates of the Colombia Caribbean Sea: Characterization of the photoprotective potential of active strains.*

- Sánchez-Suárez, J., Díaz, L., Coy-Barrera, E., & Villamil, L. (2022). Specialized Metabolism of *Gordonia* Genus: An Integrated Survey on Chemodiversity Combined with a Comparative Genomics-Based Analysis. *BioTech*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/biotech11040053>
- Sánchez-Suárez, J., Díaz, L., Melo-Bolivar, J., & Villamil, L. (2022). Draft genome sequence data of *Gordonia hongkongensis* strain EUFUS-Z928 isolated from the octocoral *Eunicea fusca*. *Data in Brief*, 42. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.108076>
- Sánchez-Suárez, J., Villamil, L., Coy-Barrera, E., & Díaz, L. (2021). Clona varians-derived actinomycetes as bioresources of photoprotection-related bioactive end-products. *Marine Drugs*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/md19120674>
- Sarmiento-tovar, A. A., Silva, L., Sánchez-Suárez, J., & Diaz, L. (2022). Streptomyces - Derived Bioactive Pigments : Ecofriendly Source of Bioactive Compounds. *MDPI*, 12(1858), 1–35. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/coatings12121858>
- Seixas Chaves, D. F. (2019). Malt Extract as a Healthy Substitute for Refined Sugar. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 4(1), 52–53. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2019.04.000758>
- Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., & Mohamed, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9>
- Sharmeen, J. B., Mahomoodally, F. M., Zengin, G., & Maggi, F. (2021). Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26030666>
- Silva, T. R., Tavares, R. S. N., Canela-garayoa, R., Eras, J., Rodrigues, M. V. N., Neri-numa, I. A., Pastore, G. M., Rosa, L. H., Schultz, J. A. A., & Debonisi, H. M. (2019). Chemical Characterization and Biotechnological Applicability of Pigments Isolated from Antarctic Bacteria. *Marine Biotechnology*, 21, 416–429. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10126-019-09892-z>
- Smaoui, S., Ennouri, K., Chakchouk-Mtibaa, A., Sellem, I., Bouchaala, K., Karray-Rebai, I., Ben Ayed, R., Mathieu, F., & Mellouli, L. (2018). Modeling-based optimization approaches for the development of Anti-Agrobacterium tumefaciens activity using *Streptomyces* sp TN71. *Microbial Pathogenesis*, 119(February), 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.006>
- Song, Q., Huang, Y., & Yang, H. (2012). Optimization of Fermentation Conditions for Antibiotic Production by Actinomycetes YJ1 Strain against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Agricultural Science*, 4(7), 95–102. <https://doi.org/10.5539/jas.v4n7p95>
- Sowani, H., Kulkarni, M., Zinjarde, S., & Javdekar, V. (2017). *Gordonia* and Related Genera as Opportunistic Human Pathogens Causing Infections of Skin, Soft Tissues, and Bones. In *The Microbiology of Skin, Soft Tissue, Bone and Joint Infections* (1st ed., Vol. 2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811079-9.00007-0>
- Takahashi, T., Ikegami-kawai, M., Okuda, R., & Suzuki, K. (2003). A fluorimetric Morgan – Elson assay method for hyaluronidase activity. *Analytical Biochemistry*, 322, 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.08.005>

- Takaichi, S., Maoka, T., Akimoto, N., Carmona, M. L., & Yamaoka, Y. (2008). Carotenoids in a corynebacterineae, *Gordonia terrae* AIST-1: Carotenoid glucosyl mycoloyl esters. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(10), 2615–2622. <https://doi.org/10.1271/bbb.80299>
- Utami, S., Sachrowardi, Q. R., Damayanti, N. A., Wardhana, A., Syarif, I., Nafik, S., Arrahmani, B. C., Kusuma, H. S. W., Widowati, W., Anggraini, N. B., Elya, B., Iskandarsyah, I., Sokmen, B. B., Onar, H. C., Yusufoglu, A., & Yanardag, R. (2018). Antioxidants, anticollagenase and antielastase potentials of ethanolic extract of ripe sesoot (*Garcinia picrorrhiza* Miq.) fruit as antiaging. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77(10), 1353–1361. <https://doi.org/10.2298/JSC120105042S>
- Vasanthabharathi, V., Lakshminarayanan, R., & Jayalakshmi, S. (2011). Melanin production from marine *Streptomyces*. *African Journal of Biotechnology*, 10(54), 11224–11234. <https://doi.org/10.5897/ajb11.296>
- Wink, J., Mohammadipanah, F., & Hamedi, J. (2017). Biology and Biotechnology of Actinobacteria. In *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1>
- Wu, Q., Zhang, G., Wang, B., Li, X., Yue, S., Chen, J., Zhang, H., & Wang, H. (2018). Production and Identification of Inthomycin B Produced by a Deep-Sea Sediment-Derived *Streptomyces* sp. YB104 Based on Cultivation-Dependent Approach. *Current Microbiology*, 75(7), 942–951. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1469-1>
- Ye, K., Fan, T., Keen, J., & Han, B. (2019). A Review of Pigments Derived from Marine Natural Products. *1805713343*, 327–338. <https://doi.org/10.1002/ijch.201800154>
- Yolmeh, M., Khomeiri, M., Ghorbani, M., & Ghaemi, E. (2017). High efficiency pigment production from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) under ultraviolet irradiation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9(December 2016), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.12.010>
- Yun, T. Y., Feng, R. J., Zhou, D. B., Pan, Y. Y., Chen, Y. F., Wang, F., Yin, L. Y., Zhang, Y. D., & Xie, J. H. (2018). Optimization of fermentation conditions through response surface methodology for enhanced antibacterial metabolite production by *Streptomyces* sp. 1-14 from cassava rhizosphere. *PLoS ONE*, 13(11), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206497>
- Zhang, S., Wang, D., Huang, J., Hu, Y., & Xu, Y. (2020). Application of capsaicin as a potential new therapeutic drug in human cancers. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 45(1), 16–28. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13039>
- Zhu, Y., Shang, X., Yang, L., Zheng, S., Liu, K., & Li, X. (2020). Purification, identification and properties of a new blue pigment produced from *Streptomyces* sp. A1013Y. *Food Chemistry*, 308(August 2019), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125600>

Material suplementario

Tabla S1. Diseño experimental de Plackett – Burman para la evaluación de los principales factores que influyen para la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes de las cepas de *G. hongkongensis* Z9.2D8 y G11.1D5, cultivadas en medio GYM.

Corrida	A	B	C	D	E	F	G	H
1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
4	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1
5	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
6	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
7	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
8	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
10	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1
11	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
12	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
13	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
14	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1
16	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1
	Niveles							
-1	0.5	2	7	20	6.5	7	20	80
1	1	6	14	40	7.5	14	30	180

A: Concentración de inóculo (g/l)

B: Concentración de fuente de carbono (g/l)

C: Concentración de fuente de nitrógeno (g/l)

D: Concentración de NaCl(g/l)

E: pH

F: Tiempo de incubación (días)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Tabla S2. Tabla S2. Diseño Box-Behnken de las tres principales variables significativas con efecto positivo en la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes de las cepas de *G. hongkongensis* Z9.2D8 y G11.1D5, cultivadas en medio GYM.

Corridas	X ₁	X ₂	X ₃
1	0	1	-1
2	0	0	0
3	1	0	-1
4	1	-1	0
5	0	0	0
6	1	0	1
7	0	-1	1
8	1	1	0
9	-1	-1	0
10	-1	1	0
11	0	-1	-1
12	-1	0	-1
13	0	1	1
14	0	0	0
15	-1	0	1

X₁, X₂, X₃: Variables independientes que ejercen efecto significativo en la producción de pigmentos y metabolitos antioxidantes de las cepas de *G. hongkongensis* Z9.2D8 y G11.1D5, cultivadas en medio GYM.

Tabla S3. Tabla S3. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman para absorbancia de extractos crudos producidos. La absorbancia de los extractos etanólicos fue medida a 490 nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Término	Efecto	Coficiente	Valor t	Valor p
Constante		0.11	34.50	0
A	0.06	0.03	10.38	0
B	0.04	0.02	6.67	0
C	0.01	0.00	1.15	0.26
D	0.01	0.00	0.83	0.42
E	0.01	0.00	1.1	0.28
F	-0,03	-0.01	-4.88	0
G	-0,03	-0.01	-4.89	0
H	0.02	0.01	2.89	0.01

A: Concentración de inóculo (g/l)

B: Concentración de fuente de carbono (g/l)

C: Concentración de fuente de nitrógeno (g/l)

D: Concentración de NaCl(g/l)

E: pH

F: Tiempo de incubación (dias)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Tabla S4. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman para absorbancia de extractos crudos producidos. La absorbancia de los extractos etanólicos fue medida a 490 nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Término	Efecto	Coef	Valor T	Valor p
Constante		33.631	73.04	0
A	9.686	4.843	10.52	0
B	-8.087	-4.044	-8.78	0
C	-2.703	-1.351	-2.93	0.01
D	8.62	4.31	9.36	0
E	-12.464	-6.232	-13.53	0
F	5.241	2.62	5.69	0
G	0.399	0.2	0.43	0.667
H	24.46	12.23	26.56	0

A: Concentración de inóculo (g/l)

B: Concentración de fuente de carbono (g/l)

C: Concentración de fuente de nitrógeno (g/l)

D: Concentración de NaCl(g/l)

E: pH

F: Tiempo de incubación (días)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Tabla S5. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman para la capacidad de captura de radicales DPPH de extractos crudos producidos medida a 515 nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Término	Efecto	Coficiente	Valor t	Valor p
Constante		32.588	47.03	0
A	1.517	0.758	1.09	0.282
B	4.628	2.314	3.34	0.002
C	5.196	2.598	3.75	0.001
D	-3.45	-1.725	-2.49	0.018
E	11.254	5.627	8.12	0
F	5.627	2.814	4.06	0
G	-28.791	-14.396	-20.78	0
H	24.949	12.474	18.00	0

A: Concentración de inóculo (g/l)

B: Concentración de fuente de carbono (g/l)

C: Concentración de fuente de nitrógeno (g/l)

D: Concentración de NaCl(g/l)

E: pH

F: Tiempo de incubación (dias)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Tabla S6. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman para la capacidad de captura de radicales DDPH de extractos crudos producidos medida a 515 nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Término	Efecto	Coefficiente	Valor t	Valor p
Constante		33.631	73.04	0
A	9.686	4.843	10.52	0
B	-8.087	-4.044	-8.78	0
C	-2.703	-1.351	-2.93	0.006
D	8.62	4.31	9.36	0
E	-12.464	-6.232	-13.53	0
F	5.241	2.62	5.69	0
G	0.399	0.2	0.43	0.667
H	24.46	12.23	26.56	0

A: Concentración de inóculo (g/l)

B: Concentración de fuente de carbono (g/l)

C: Concentración de fuente de nitrógeno (g/l)

D: Concentración de NaCl(g/l)

E: pH

F: Tiempo de incubación (días)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Tabla S7. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman para La capacidad de captura de radicales ABTS de extractos crudos producidos medida a 735 nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Término	Efecto	Coficiente	Valor t	Valor p
Constante		36.174	163.89	0
A	8.606	4.303	19.5	0
B	2.45	1.225	5.55	0
C	0.667	0.333	1.51	0.141
D	-4.951	-2.475	-11.22	0
E	1.693	0.846	3.83	0.001
F	1.388	0.694	3.15	0.004
G	-10.275	-5.137	-23.28	0
H	9.746	4.873	22.08	0

A: Concentración de inóculo (g/l)

B: Concentración de fuente de carbono (g/l)

C: Concentración de fuente de nitrógeno (g/l)

D: Concentración de NaCl(g/l)

E: pH

F: Tiempo de incubación (dias)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Tabla S8. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman para La capacidad de captura de radicales ABTS de extractos crudos producidos medida a 735 nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Término	Efecto	Coef	Valor T	Valor p
Constante		40.457	213.3	0
A	7.737	3.869	20.4	0
B	-1.823	-0.911	-4.81	0
C	7.437	3.718	19.6	0
D	-1.225	-0.612	-3.23	0.003
E	-3.388	-1.694	-8.93	0
F	2.671	1.335	7.04	0
G	-12.966	-6.483	-34.18	0
H	29.224	14.612	77.04	0

A: Concentración de inóculo (g/l)

B: Concentración de fuente de carbono (g/l)

C: Concentración de fuente de nitrógeno (g/l)

D: Concentración de NaCl(g/l)

E: pH

F: Tiempo de incubación (días)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Tabla S9. Análisis estadístico del diseño Box-Behnken para absorbancia de extractos crudos producidos medida a 490 nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Factor	Coficiente	Valor t	Valor p
Constante	-17.53	-3.16	0.003
A	-1.815	-2.95	0.006
G	0.1429	2.25	0.031
H	0.2014	3.37	0.002
A*A	0.074	1.12	0.268
G*G	-0.00138	-2.1	0.043
H*H	-0.00056	-3.39	0.002
A*G	0.018	2.85	0.007
A*H	0.00663	2.1	0.043
G*H	-0.00071	-2.24	0.032

A: Concentración de inóculo (g/l)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Tabla S10. Análisis estadístico del diseño Box-Behnken para la producción de pigmento (absorbancia) de extractos crudos producidos medida a 490 nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Término	Coefficiente	Valor t	Valor p
Constante	-23.8	-2.33	0.026
A	0.99	0.87	0.389
G	0.55	4.71	0
H	0.195	1.77	0.085
A*A	-0.656	-5.42	0
G*G	-0.011	-8.85	0
H*H	-0.001	-1.71	0.097
A*G	-0.008	-0.73	0.473
A*H	0.007	1.18	0.248
G*H	-0.001	-1.09	0.282

A: Concentración de inóculo (g/l)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Tabla S11. Análisis estadístico del diseño Box-Behnken para la capacidad de captura de radicales libres DPPH de extractos crudos producidos medida a 515 nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Factor	Coefficiente	Valor t	Valor p
Constante	2684	3.55	0.001
A	-376.9	-4.5	0
G	52.15	6.04	0
H	-31.92	-3.92	0
A*A	34.64	3.87	0
G*G	-0.063	-0.7	0.487
H*H	0.105	4.67	0
A*G	6.776	7.87	0
A*H	0.726	1.69	0.1
G*H	-0.334	-7.77	0

A: Concentración de inóculo (g/l)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Tabla S12. Análisis estadístico del diseño Box-Behnken para la capacidad de captura de radicales DPPH de extractos crudos producidos medida a 515 nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Término	Coefficiente	Valor t	Valor p
Constante	10890	12.44	0
A	36.6	0.38	0.708
G	4.1	0.41	0.688
H	-121.18	-12.86	0
A*A	87.7	8.45	0
G*G	0.711	6.85	0
H*H	0.351	13.53	0
A*G	-0.966	-0.97	0.339
A*H	-1.487	-2.98	0.005
G*H	-0.172	-3.45	0.001

A: Concentración de inóculo (g/l)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

Tabla S13. Análisis estadístico del diseño Box-Behnken para la capacidad de captura de radicales ABTS de extractos crudos producidos medida a 735 nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

Factor	Coefficiente	Valor t	Valor p
Constante	1192	1.04	0.305
A	-263	-2.07	0.046
G	82.3	6.29	0
H	-19	-1.54	0.132
A*A	28.9	2.13	0.04
G*G	-0.859	-6.34	0
H*H	0.065	1.91	0.064
A*G	1.64	1.26	0.217
A*H	0.716	1.1	0.279
G*H	-0.287	-4.4	0

A: Concentración de inóculo (g/l)

G: Temperatura (°C)

H: Velocidad de agitación (rpm)

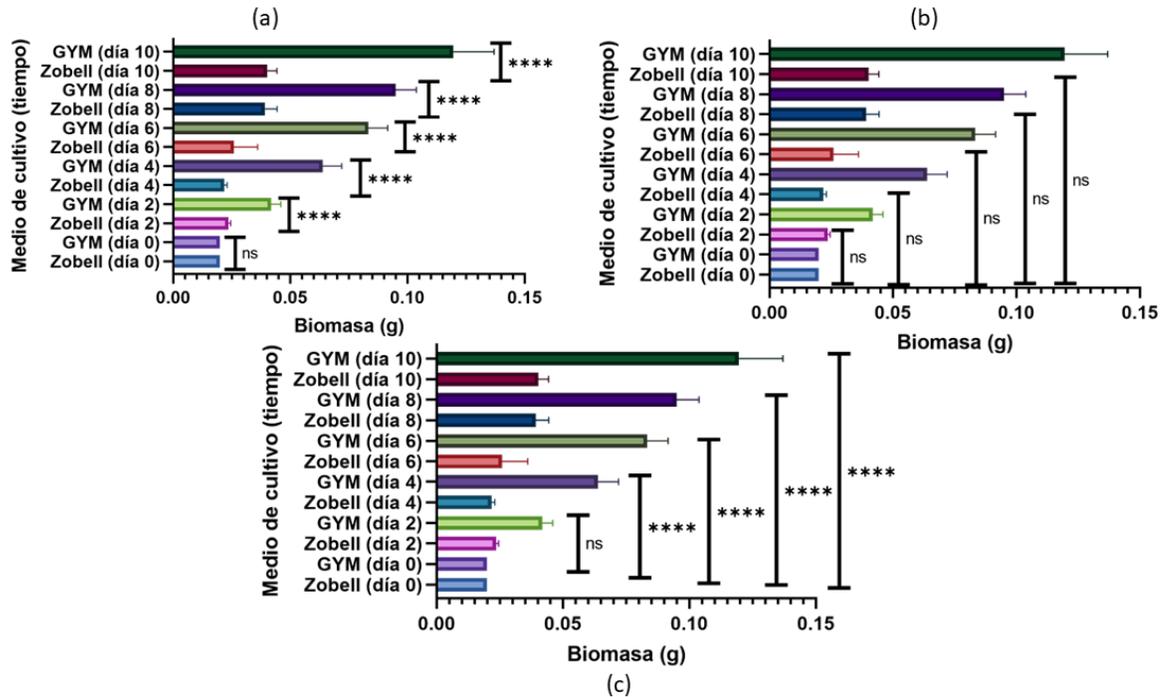


Figura S1. Efecto del medio de cultivo sobre la biomasa producida (peso seco) en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

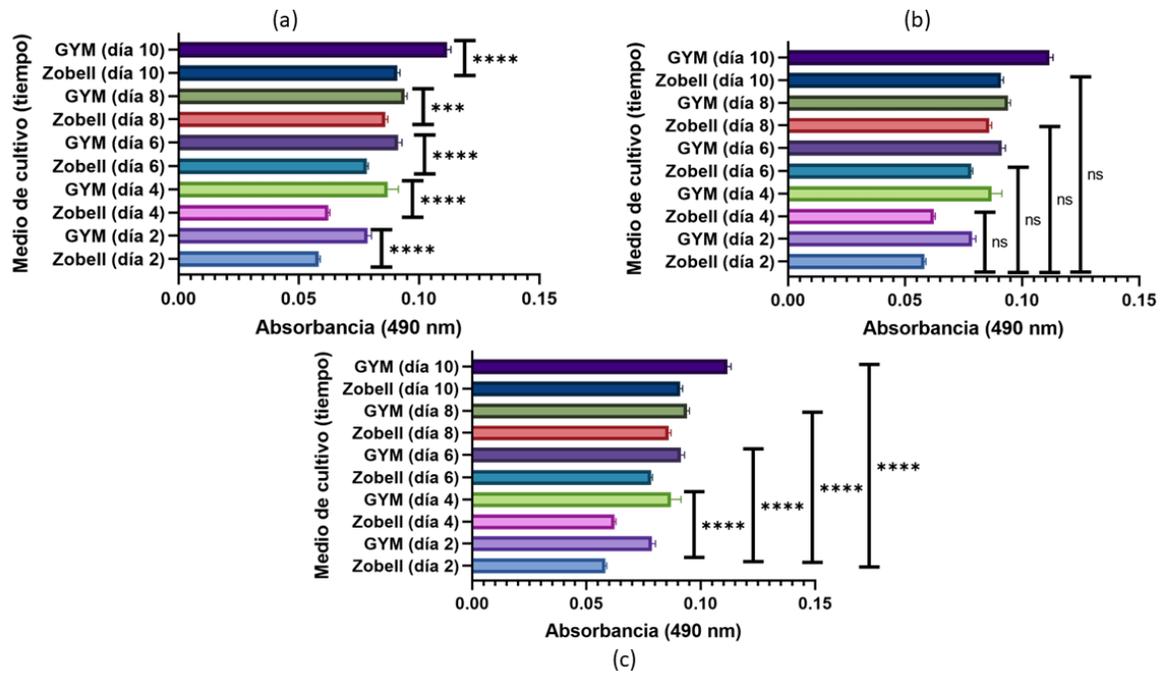


Figura S2. Efecto del medio de la fuente de carbono sobre la absorbancia (490 nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

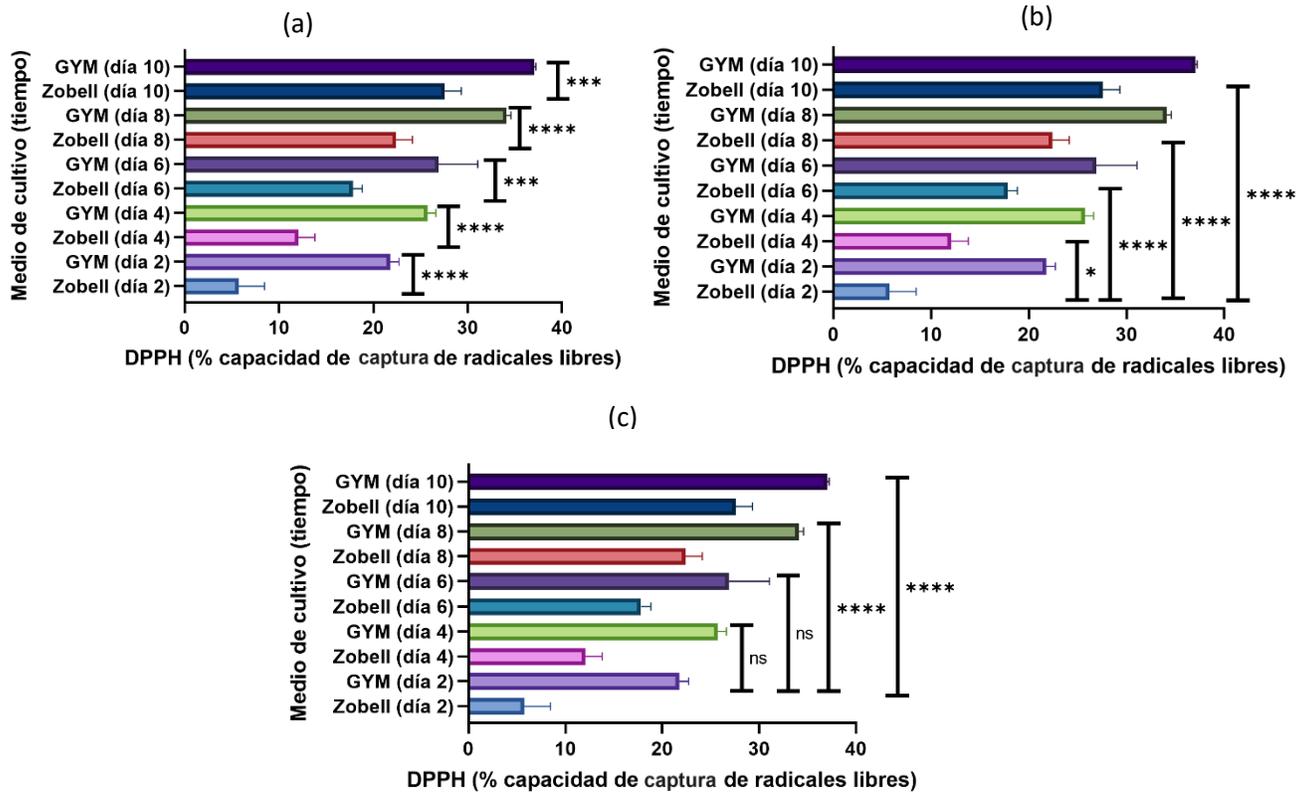


Figura S7. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de captura de radicales DPPH (515nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

Figura S8. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de captura de radicales DPPH (515nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

Figura S9. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de captura de radicales DPPH (515nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

Figura S10. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de captura de radicales DPPH (515nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

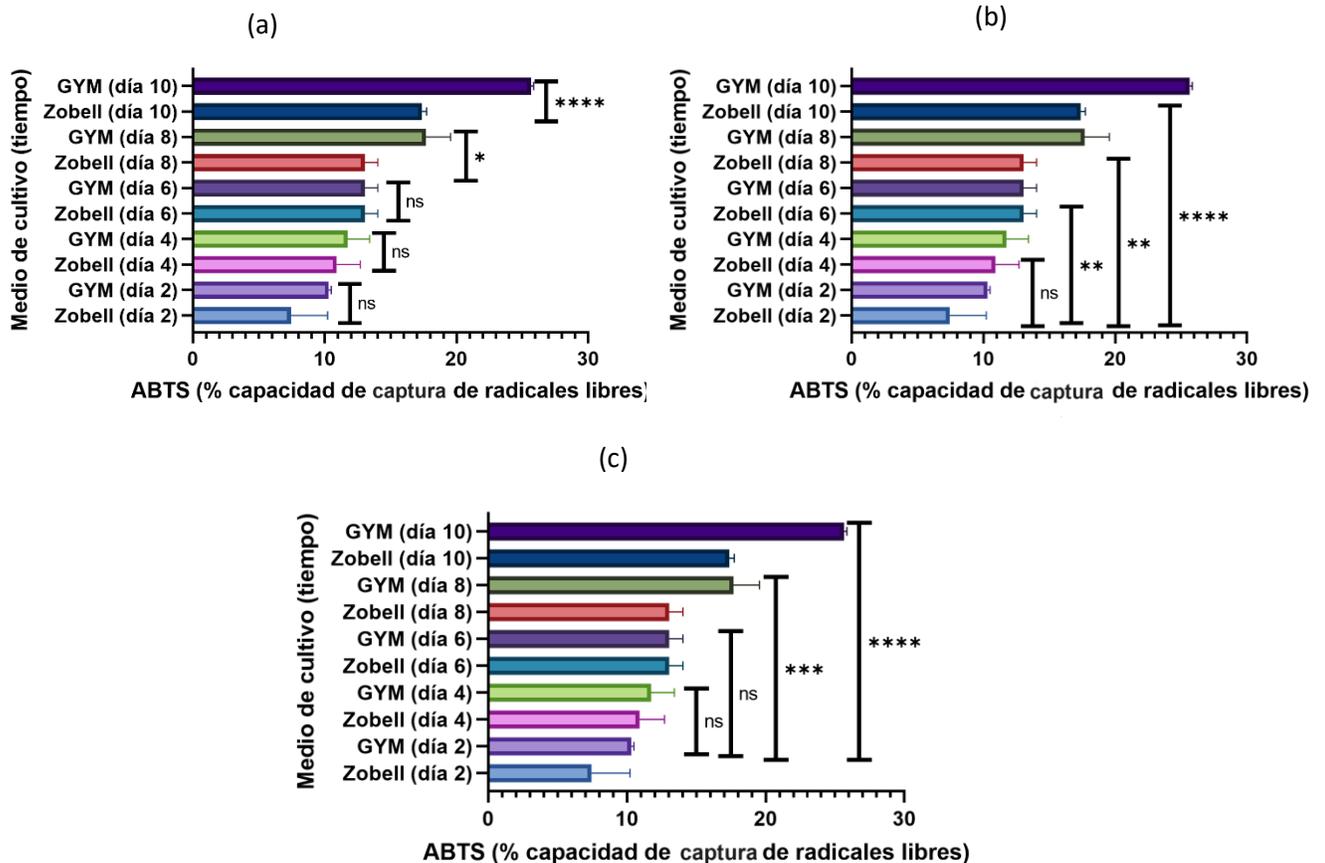


Figura S15. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de captura de radicales ABTS (735nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

Figura S16. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de captura de radicales ABTS (735nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

Figura S17. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de captura de radicales ABTS (735nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

Figura S18. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de captura de radicales ABTS (735nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa

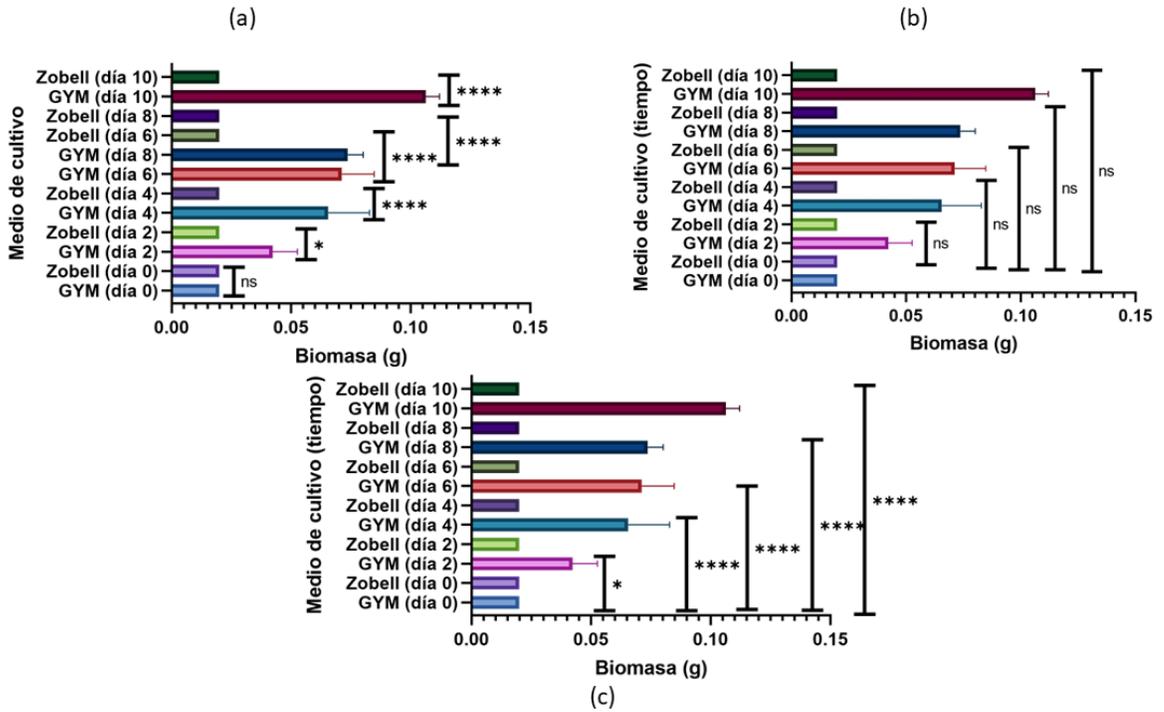


Figura S19. Efecto del medio de cultivo sobre la biomasa producida (peso seco) en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

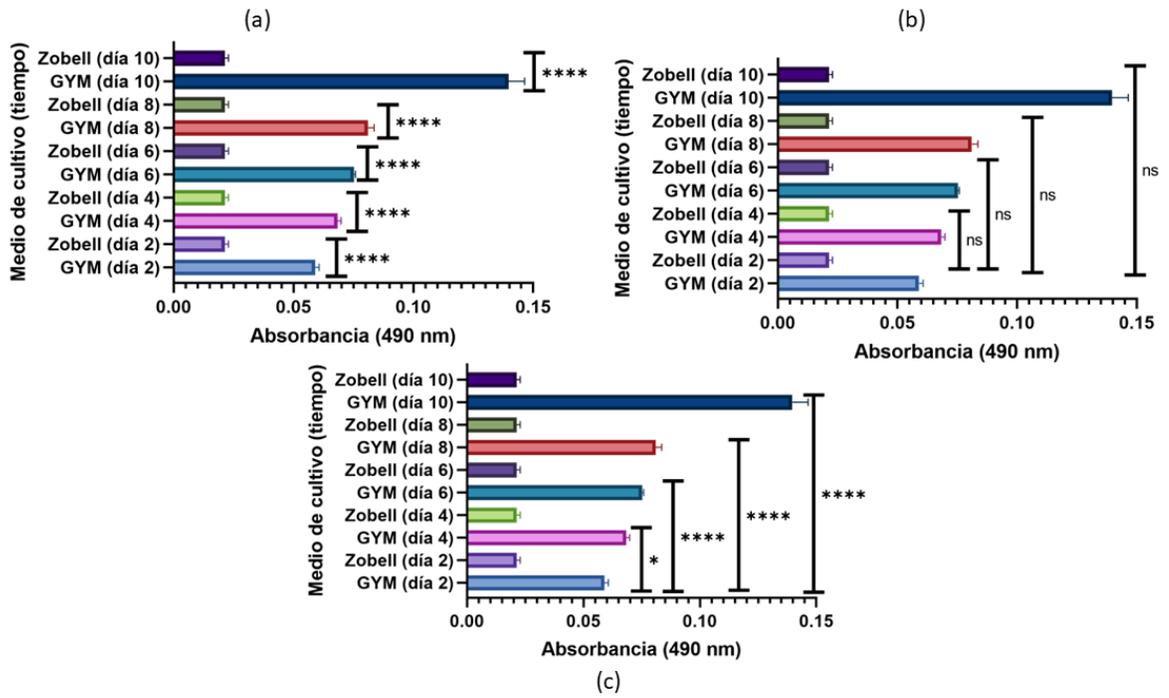


Figura S20. Efecto del medio de la fuente de carbono sobre la absorbancia (490 nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

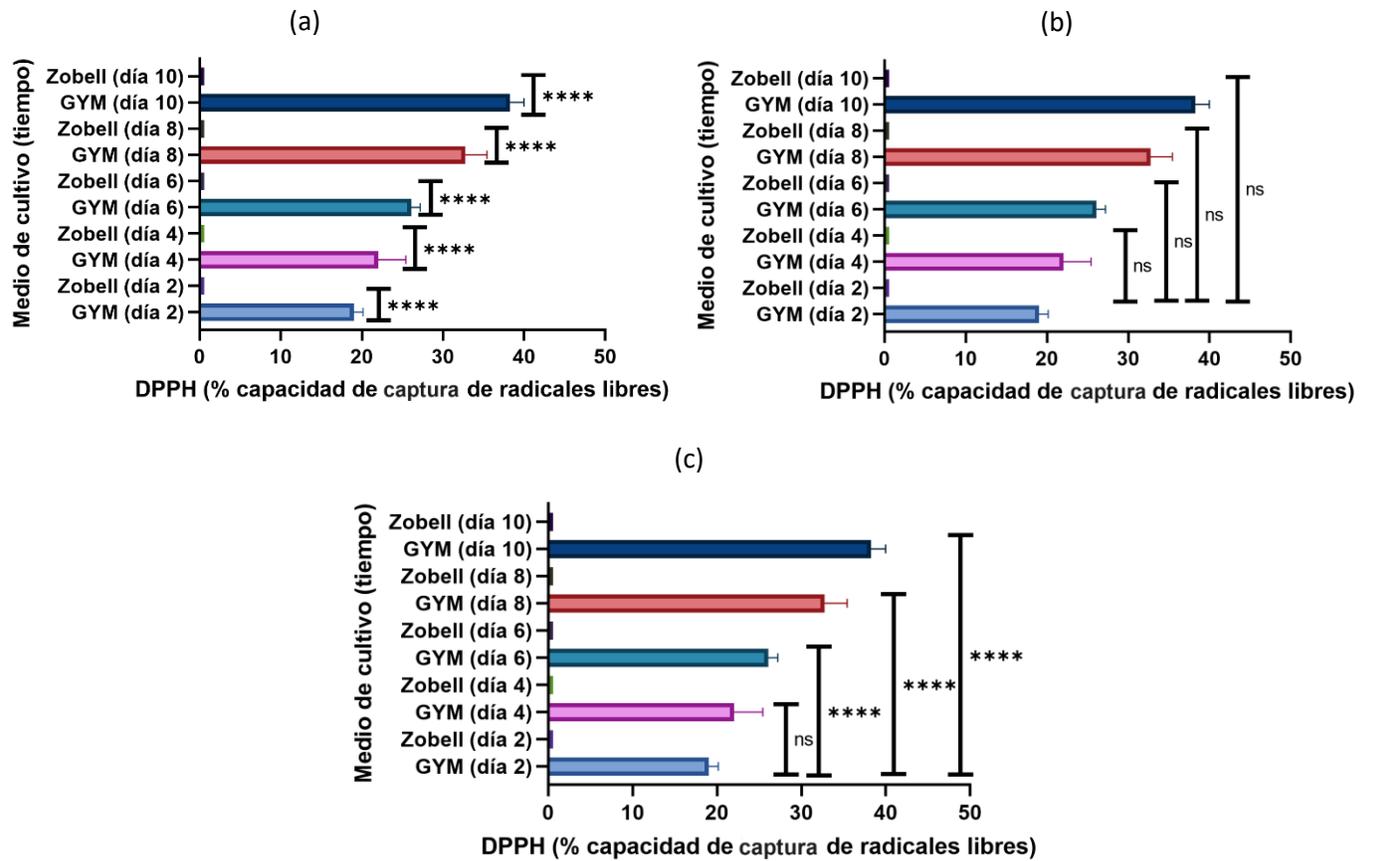


Figura S21. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de captura de radicales DPPH (515nm) de los extractos etanólicos crudos producidos en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

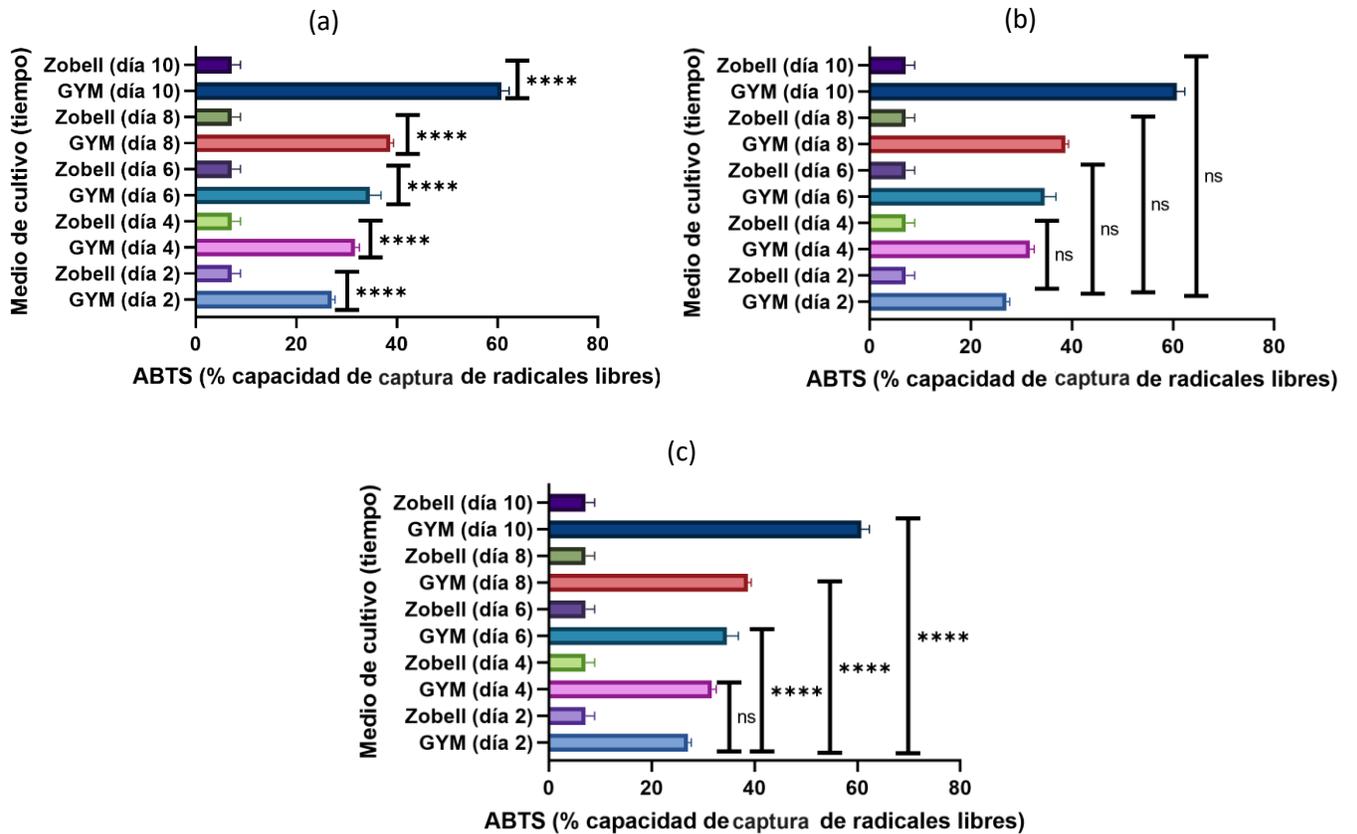


Figura S22. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de barrido de radicales ABTS (735nm) de los extractos etanólicos producidos en 10 días de incubación. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivadas en medio GYM y Zobell. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

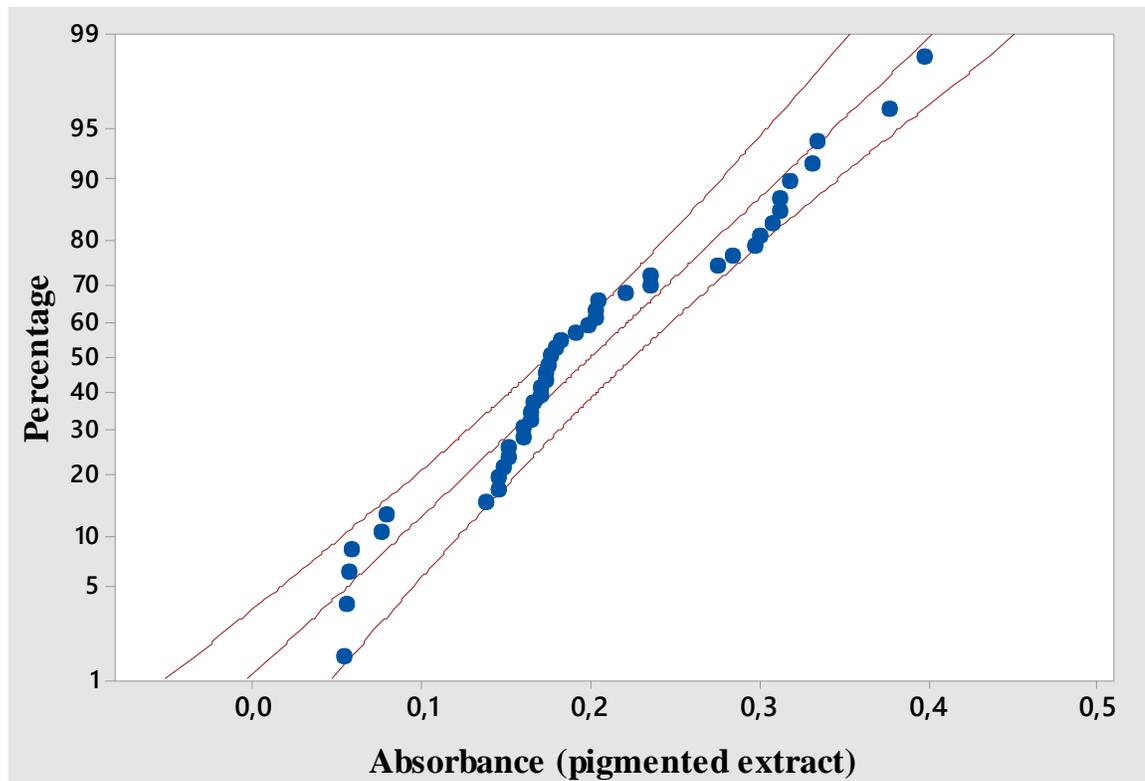


Figura S23. Gráfico de probabilidad normal de los residuos generado a partir del diseño de superficie de respuesta para mejorar la producción de pigmento (absorbancia) de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8. La absorbancia de los extractos etanólicos crudos fue medida a 490 nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM.

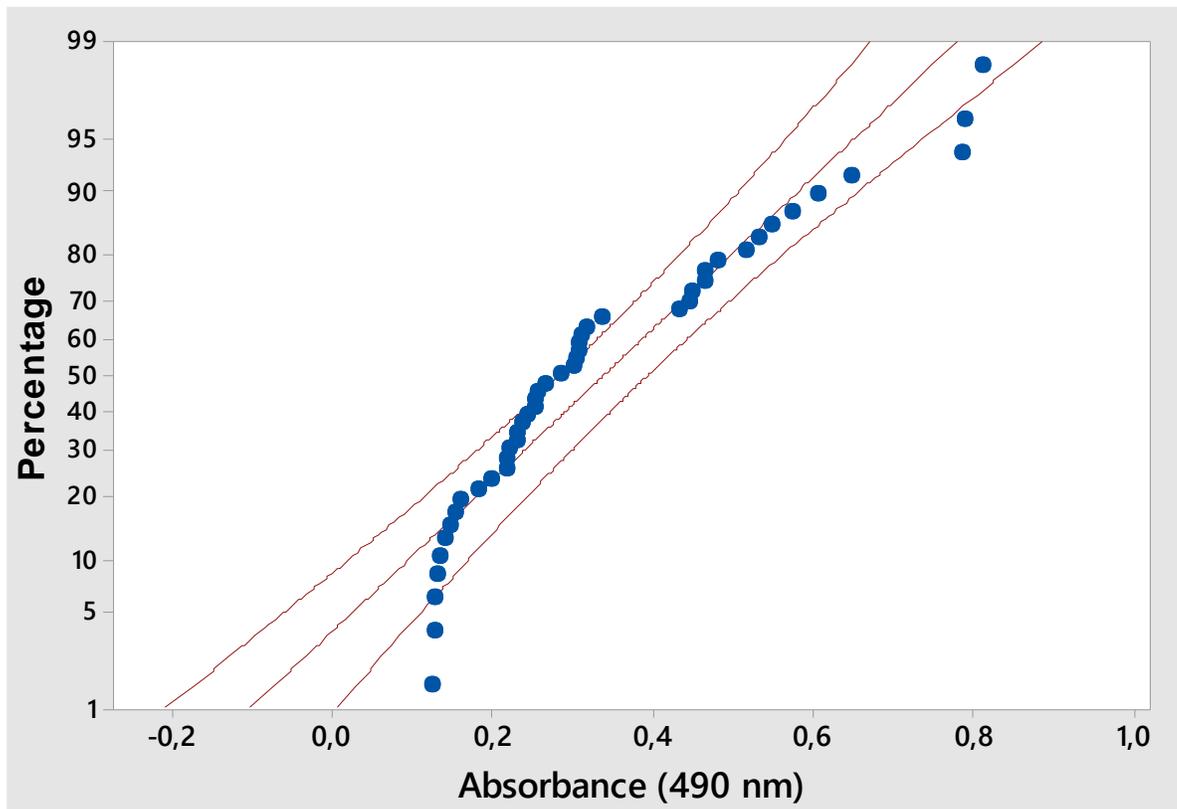
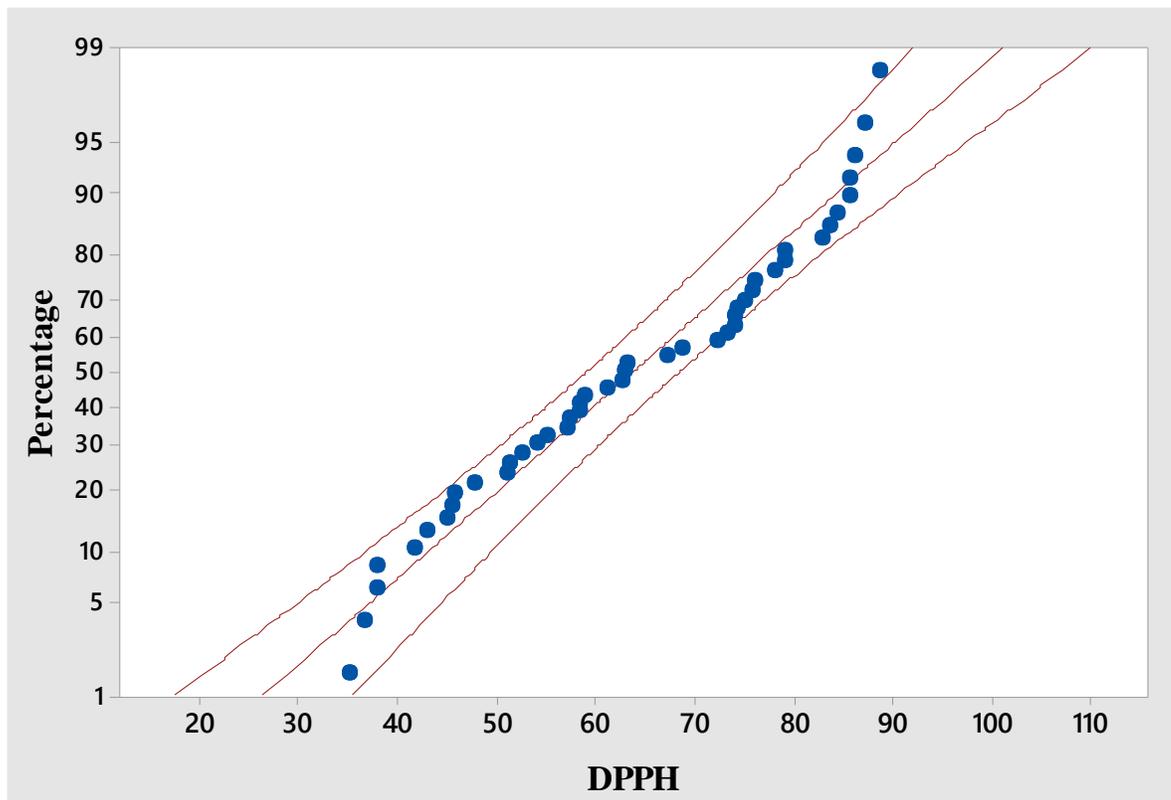
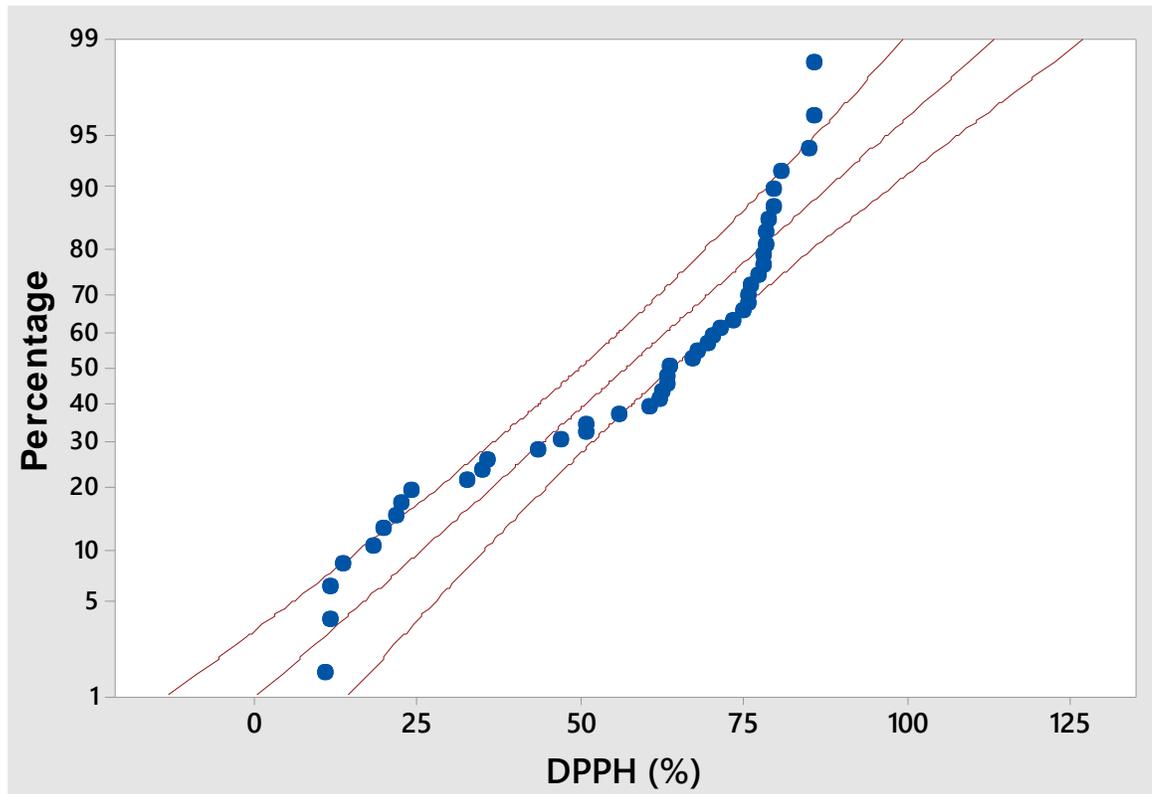


Figura S24. Gráfico de probabilidad normal de los residuos generado a partir del diseño de superficie de respuesta para mejorar la producción de pigmento (absorbancia) de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5. La absorbancia de los extractos etanólicos crudos fue medida a 490 nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM.



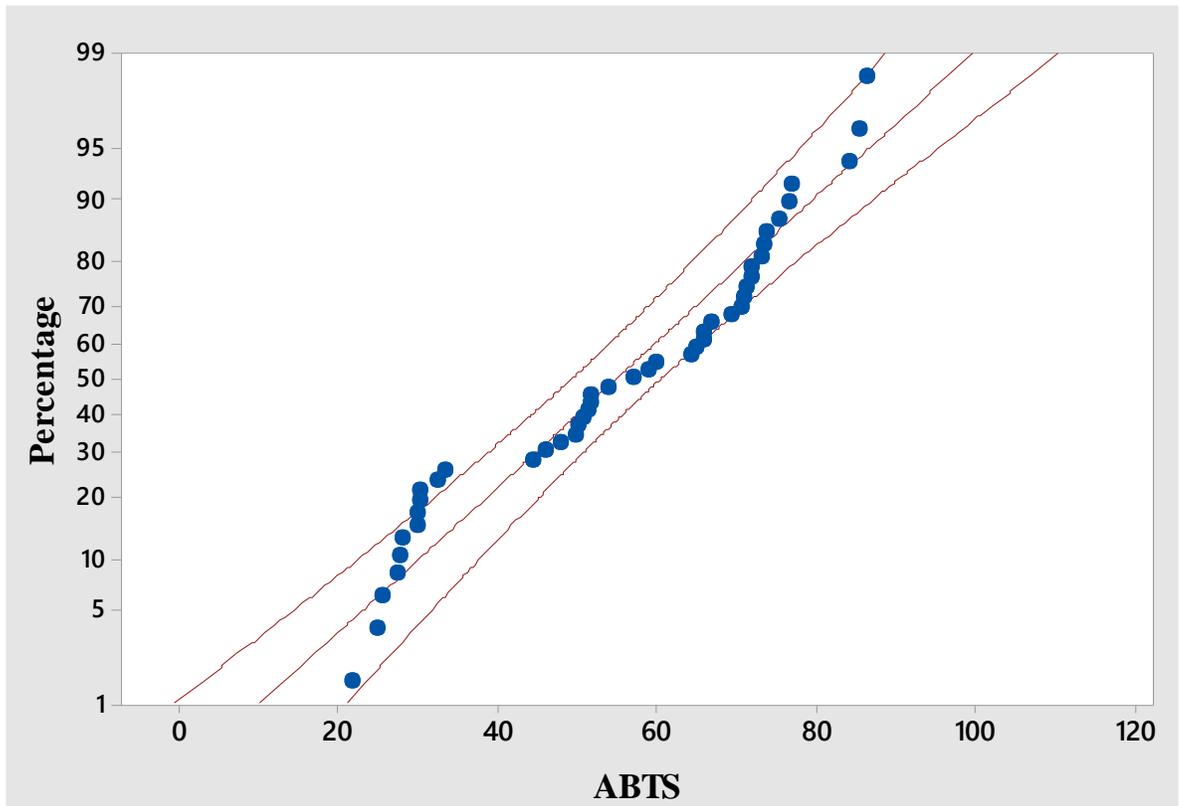
DPPH: Capacidad de captura de radicales DPPH (%)

Figura S25. Gráfico de probabilidad normal de los residuos generado a partir del diseño de superficie de respuesta para mejorar capacidad de captura de radicales DPPH del extracto crudo de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8. La capacidad de captura de radicales DPPH de los extractos etanólicos crudos fue medida a 515 nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM.



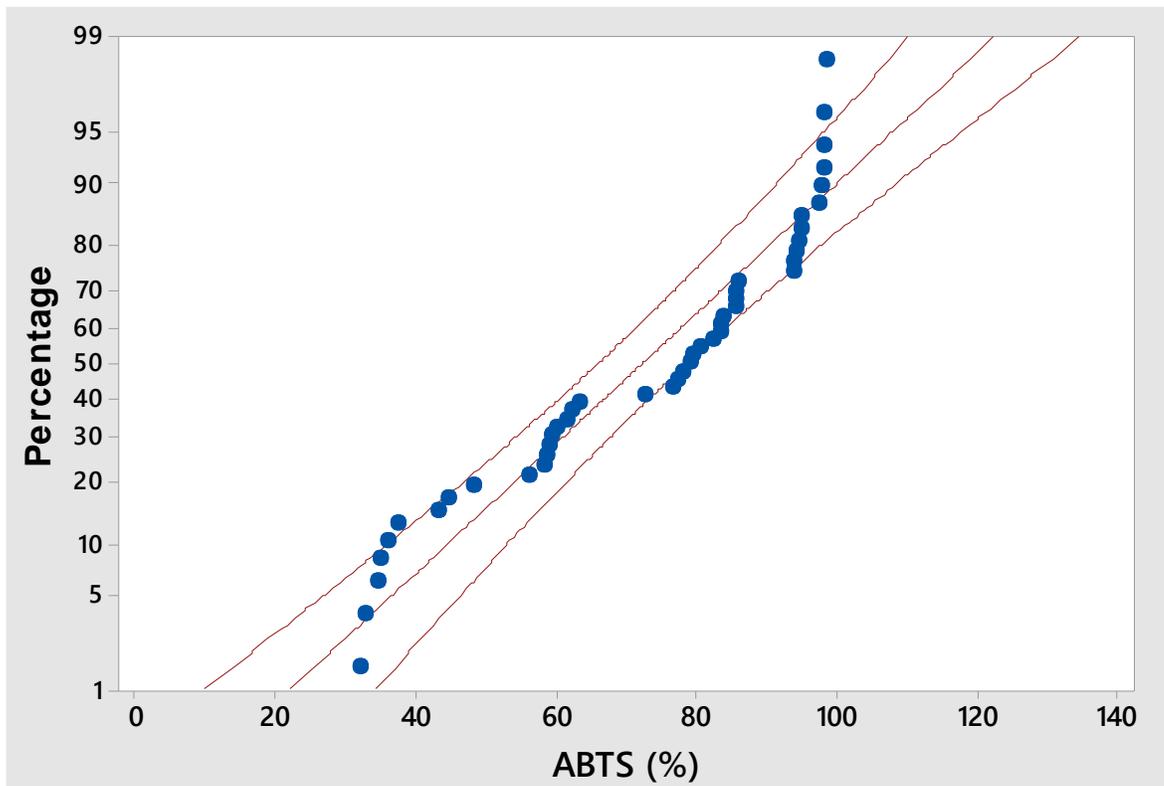
DPPH (%): Capacidad de captura de radicales DPPH

Figura S26. Gráfico de probabilidad normal de los residuos generado a partir del diseño de superficie de respuesta para mejorar capacidad de captura de radicales DPPH del extracto crudo de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5. La capacidad de captura de radicales DPPH de los extractos etanólicos crudos fue medida a 515 nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM.



ABTS: Capacidad de captura de radicales ABTS (%)

Figura S27. Gráfico de probabilidad normal de los residuos generado a partir del diseño de superficie de respuesta para mejorar capacidad de captura de radicales ABTS del extracto crudo de la cepa *G. hongkongensis* Z9.2D8. La capacidad de barrido de radicales ABTS de los extractos etanólicos crudos fue medida a 735 nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivada en medio GYM.



ABTS (%): Capacidad de captura de radicales ABTS (%)

Figura S28. Gráfico de probabilidad normal de los residuos generado a partir del diseño de superficie de respuesta para mejorar capacidad de barrido de radicales ABTS del extracto crudo de la cepa *G. hongkongensis* G11.1D5. La capacidad de captura de radicales ABTS de los extractos etanólicos crudos fue medida a 735 nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivada en medio GYM.

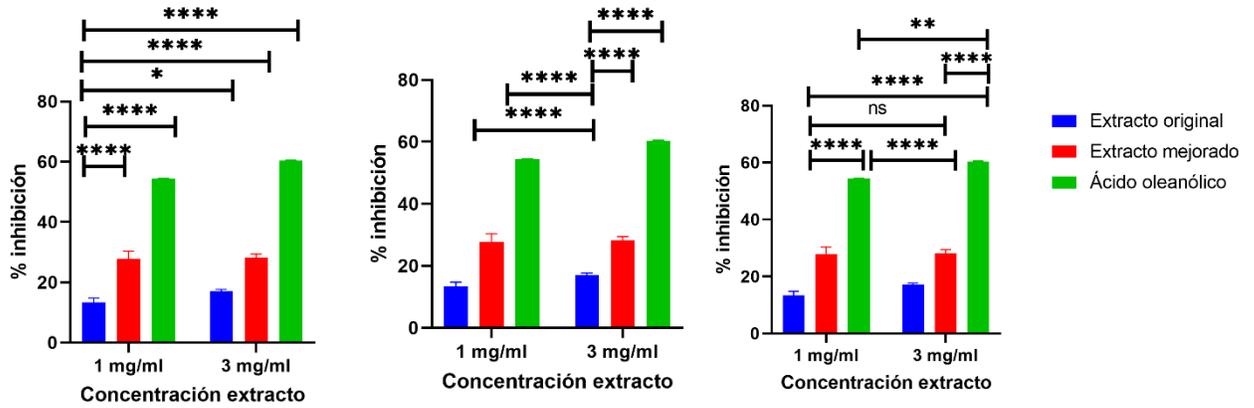


Figura S29. Comparación múltiple de tratamientos del efecto de la concentración del extracto etanólico crudo con presencia de pigmento y actividad antioxidante en la inhibición de la enzima colagenasa medida a 600nm. *G. hongkongensis* Z9.2D8 cultivadas en medio GYM. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

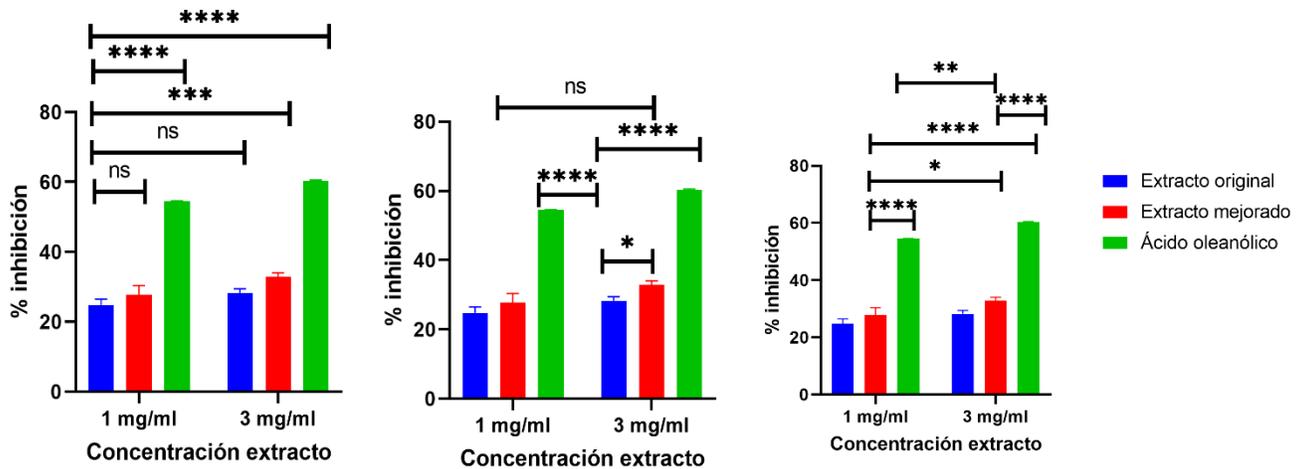


Figura S30. Comparación múltiple de tratamientos del efecto de la concentración del extracto etanólico con presencia de pigmento y actividad antioxidante en la inhibición de la enzima colagenasa medida a 600nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivadas en medio GYM. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

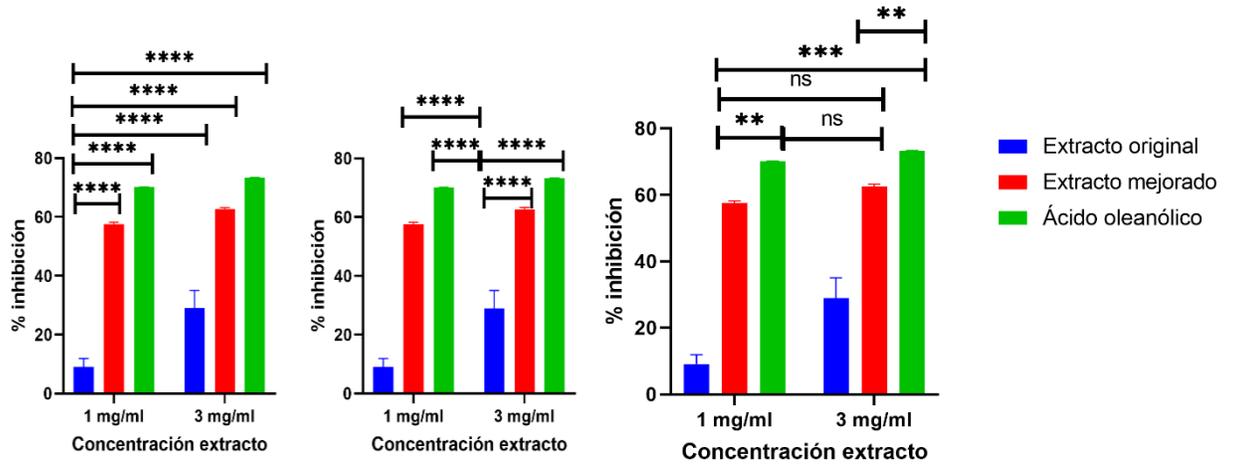
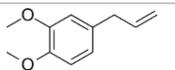
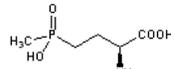
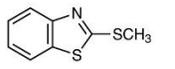
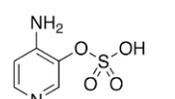
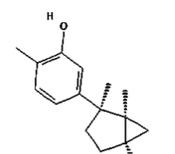
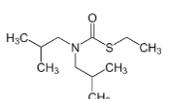
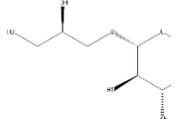
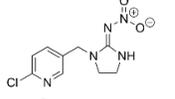
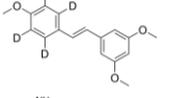
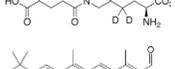
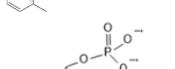
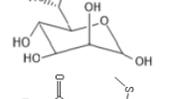
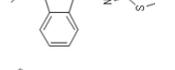
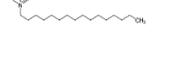
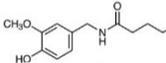
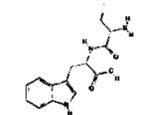
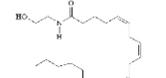
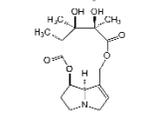
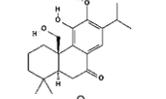
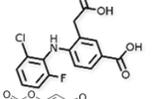
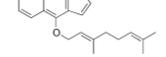
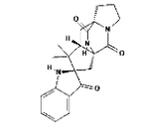
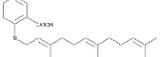
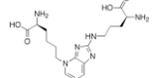
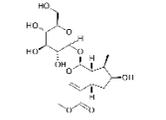
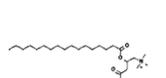
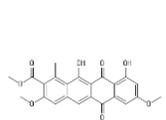
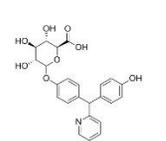
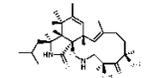
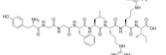


Figura S31. Comparación múltiple de tratamientos del efecto de la concentración del extracto etanólico con presencia de pigmento y con actividad antioxidante en la inhibición de la enzima hialuronidasa medida a 600nm. *G. hongkongensis* G11.1D5 cultivadas en medio GYM. Las barras representan la media de tres ensayos independientes con su respectiva desviación estándar. Los asteriscos representan que hay diferencia significativa y la sigla ns, muestra que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

Tabla S15. Posibles compuestos encontrados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) de los extractos crudos con presencia de pigmento y actividad antioxidante de *G. hongkongensis* Z9.2D8. Cultivada en medio GYM. Los resultados obtenidos fueron procesados en mz-mine y CEUmass.

m/z	Tiempo de retención	Compuesto	Fórmula	Estructura
178,10	23,1	Methyleugenol	C11H14 O2	
179,15	1,2	L-Phosphinothricin	C5H12N O4P	
181,05	4,9	2-Methylthiobenzothiazole	C8H7NS 2	
190,30	7,9	3-Hydroxy-4-aminopyridine sulfate	C5H6N2 O4S	
216,30	2,4	iso-Debromolaurinterol	C15H20 O	
217,25	9,9	Butylate	C11H23N OS	
254,10	23	Galactosylglycerol	C9H18O 8	
255,05	31,9	Imidacloprid	C9H10Cl N5O2	
274,15	6,4	trans-trimethoxy Resveratrol-d4	C17H14D 4O3	
275,15	27,1	Glutamyllysine	C11H21N 3O5	
282,20	13	all-trans-Dehydroretinal	C20H26 O	
290,05	25,8	D-glycero-beta-D-manno-Heptose 7-phosphate	C7H15O 10P	
294,05	2,3	Wasalexin A	C13H14N 2O2S2	
303,30	18,5	Cetylpyridinium	C21H37N	

305,20	12,9	Capsaicin	C ₁₈ H ₂₇ N O ₃	
307,10	25	Cysteinyl-Tryptophan	C ₁₄ H ₁₇ N 3O ₃ S	
319,25	10,1	Anandamide	C ₂₀ H ₃₃ N O ₂	
321,05	24,7	Monocrotaline	C ₁₆ H ₂₃ N O ₆	
332,20	6,5	11,20-Dihydroxysugiol	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	
337,05	9,1	5-Carboxylumiracoxib	C ₁₆ H ₁₃ C IFNO ₄	
338,15	31,1	Bergamottin	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	
345,16	7,1	Brevianamide	C ₂₁ H ₁₉ N 3O ₂	
349,25	9,4	Farnesyl Thiosalicylic acid	C ₂₂ H ₃₀ O ₂ S	
378,20	26,9	Pentosidine	C ₁₇ H ₂₆ N 6O ₄	
390,15	8,6	Loganin	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	
413,35	10,8	Heptadecanoyl carnitine	C ₂₄ H ₄₇ N O ₄	
422,10	31,9	Tetracenomycin A2	C ₂₃ H ₁₈ O ₈	
425,15	12,9	Bisacodyl diphenol glucuronide	C ₂₃ H ₂₃ N O ₇	
433,25	10,3	Flavichalasin	C ₂₄ H ₃₅ N O ₆	
445,30	19,3	Dynorphin	C ₂₀ H ₃₉ N 5O ₆	

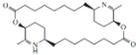
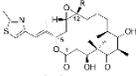
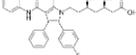
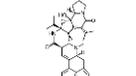
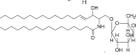
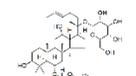
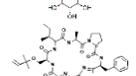
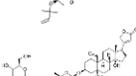
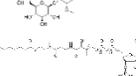
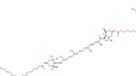
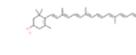
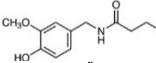
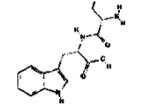
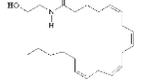
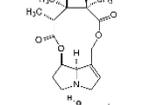
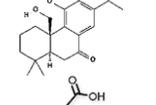
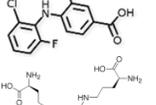
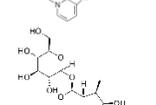
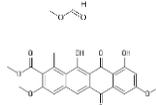
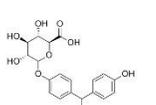
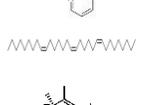
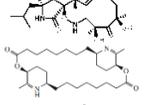
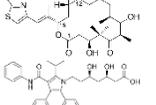
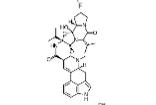
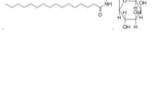
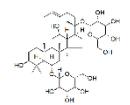
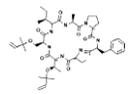
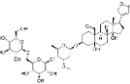
474,35	20,9	Dehydrocarpaine II	C28H46N 2O4	
493,25	16,6	Epothilone	C26H39N O6S	
548,65	19	Atorvastatin	C33H35F N2O5	
561,75	8,2	Ergocornine	C31H39N 5O5	
643,50	6,9	Galactosylceramide (d18:1/12:0)	C36H69N O8	
784,50	8	Ginsenoside Rg3	C42H72 O13	
837,45	3,5	Trunkamide A	C43H63N 7O8S	
872,40	5,4	k-Strophanthoside	C42H64 O19	
891,20	5,5	S-2-Octenoyl CoA	C29H48N 7O17P3S	
1144,90	3,1	Fucoxanthinol 3,3'- dioleate	C76H120 O7	
1150,85	5,9	3-Hydroxy-b,e- caroten-3'-one	C40H5 4O2	

Tabla S16. Posibles compuestos encontrados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) de los extractos crudos con presencia de pigmento y con actividad antioxidante de *G. hongkongensis* G11.1D5. Cultivada en medio GYM. Los resultados obtenidos fueron procesados en mz-mine y CEUmass.

m/z	Tiempo de retención	Compuesto	Fórmula	Estructura
177,99	23,1	Methyleugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	
179,05	1,2	L-Phosphinothricin	C ₅ H ₁₂ NO ₄ P	
181	4,9	2-Methylthiobenzothiazole	C ₈ H ₇ NS ₂	
190,15	7,9	3-Hydroxy-4-aminopyridine 3sulfate	C ₅ H ₆ N ₂ O ₄ S	
216,02	2,4	iso-Debromo-laurinterol	C ₁₅ H ₂₀ O	
217,18	9,9	Butylate	C ₁₁ H ₂₃ NOS	
253,99	23	Galactosylglycerol	C ₉ H ₁₈ O ₈	
254,99	31,9	Imidacloprid	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	
275,25	27,1	Glutamyllysine	C ₁₁ H ₂₁ NO ₅	
290,12	25,8	D-glycero-beta-D-manno- Heptose 7-phosphate	C ₇ H ₁₅ O ₁₀ P	
294,15	2,3	Wasalexin A	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂	
303,2	18,5	Cetylpyridinium	C ₂₁ H ₃₇ N	

m/z	Tiempo de retención	Compuesto	Fórmula	Estructura
305,25	12,9	Capsaicin	C ₁₈ H ₂₇ NO ₃	
307,15	25	Cysteinyl-Tryptophan	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃ S	
319,12	10,1	Anandamide	C ₂₀ H ₃₃ NO ₂	
321	24,7	Monocrotaline	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	
331,95	6,5	11,20-Dihydroxysugiol	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	
337,12	9,1	5-Carboxy-lumiracoxib	C ₁₆ H ₁₃ ClFNO ₄	
378,12	26,9	Pentosidine	C ₁₇ H ₂₆ N ₆ O ₄	
390,15	8,6	Loganin	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	
422,1	31,9	Tetracenomycin A2	C ₂₃ H ₁₈ O ₈	
425,15	12,9	Bisacodyl diphenol glucuronide	C ₂₃ H ₂₃ NO ₇	
430,50	25,5	9Z,15Z,22Z-hentriacontatriene	C ₃₁ H ₅₈	
432,95	10,3	Flavichalasin	C ₂₄ H ₃₅ NO ₆	
474,35	20,9	Dehydrocarpaine II	C ₂₈ H ₄₆ N ₂ O ₄	
493,25	16,6	Epothilone	C ₂₆ H ₃₉ NO ₆ S	
548,63	19	Atorvastatin	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅	
561,75	8,2	Ergocornine	C ₃₁ H ₃₉ N ₅ O ₅	
643,55	6,9	Galactosylceramide	C ₃₆ H ₆₉ NO ₈	

m/z	Tiempo de retención	Compuesto	Fórmula	Estructura
784,49	8	Ginsenoside Rg3	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	
837,45	3,5	Trunkamide A	C ₄₃ H ₆₃ N ₇ O ₈ S	
872,4	5,4	k-Strophanthoside	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₉	
891,2	5,5	S-2-Octenoyl CoA	C ₂₉ H ₄₈ N ₇ O ₁₇ P ₃ S	
1094,94	27	1,2-Dihydrolycopene	C ₄₀ H ₅₈	