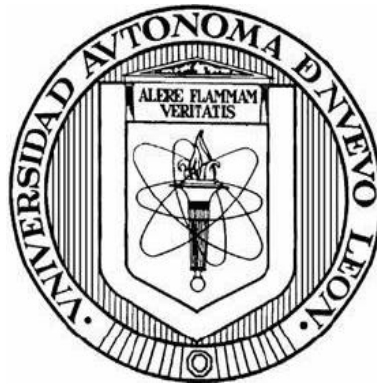


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



OBTENCIÓN DE UN PIGMENTO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA,
NO TÓXICO Y ESTABLE A DIFERENTES CONDICIONES AMBIENTALES
A PARTIR DE UN HONGO FILAMENTOSO METALOTOLERANTE

Por

L.B.G. LIDIA KARINA SOSA VALDÉS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2025

OBTENCIÓN DE UN PIGMENTO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA,
NO TÓXICO Y ESTABLE A DIFERENTES CONDICIONES AMBIENTALES
A PARTIR DE UN HONGO FILAMENTOSO METALOTOLERANTE

Comité de Tesis



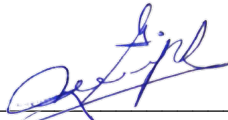
Dra. Katiushka Arevalo Niño
Presidente



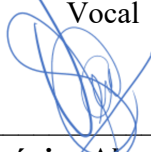
Dr. Luis J. Galán Wong
Secretario



Dra. Susana de la Torre Zavala
Vocal



Dra. Ma. Guadalupe Rojas Verde
Vocal



Dra. Verónica Almaguer Cantú
Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Niño
Subdirectora de Posgrado



**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

OBTENCIÓN DE UN PIGMENTO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA,
NO TÓXICO Y ESTABLE A DIFERENTES CONDICIONES AMBIENTALES
A PARTIR DE UN HONGO FILAMENTOSO METALOTOLERANTE

Dirección de Tesis



Dra. Katushka Arévalo Niño

Directora

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Programa de Becas para Estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), ahora Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) del Gobierno de México, CVU 1311859.

DEDICATORIAS

A la parte de mí que quiso rendirse muchas veces, pero se quedó.

A la que aprendió a confiar en sí misma cuando no quedaba nadie más cerca.

Este trabajo no es un homenaje a la perfección, ni a la disciplina, ni a la constancia esperada por otros. Es el testimonio de una lucha más íntima: la de sostenerme, reinventarme y seguir adelante, incluso cuando la motivación se agotaba.

Gracias a quienes estuvieron presentes de verdad, aunque no siempre supieran cómo.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	3
2.1 Pigmentos.....	3
2.2 Pigmentos sintéticos.....	3
2.3 Pigmentos naturales.....	3
2.4 Pigmentos producidos por microorganismos.....	4
2.5 Hongos productores de pigmentos.....	5
2.6 Pigmentos fúngicos.....	5
2.7 Aplicaciones.....	6
2.8 Hongos extremófilos productores de pigmentos....	7
3. Justificación.....	9
4. Hipótesis.....	10
5. Objetivo del trabajo.....	11
5.1 Objetivo general.....	11
5.2 Objetivos particulares.....	11
6. Material y Métodos.....	12
6.1 Reactivación de la cepa metalotolerante.....	12
6.2 Caracterización morfológica.....	12
6.3 Identificación molecular.....	12
6.4 Determinación de punto estacionario.....	13
6.5 Obtención de extracto pigmentado.....	13
6.6 Determinación de $\lambda_{\text{máx}}$	13
6.7 Evaluación de condiciones de cultivo.....	14
6.8 Rendimiento.....	14
6.9 Cromatografía en capa fina (TLC).....	15
6.10 Análisis de estabilidad.....	15
6.11 Prueba antimicrobiana.....	16
6.12 Prueba de toxicidad.....	16
6.13 Análisis estadístico.....	17

7. Resultados y discusiones	18
7.1 Caracterización morfológica.....	18
7.2 Identificación molecular.....	19
7.3 Determinación del punto estacionario.....	20
7.4 Determinación de $\lambda_{\text{máx}}$	21
7.5 Evaluación de condiciones de cultivo.....	23
7.6 Rendimiento.....	27
7.7 Cromatografía en capa fina (TLC).....	28
7.8 Ensayos de estabilidad.....	29
7.9 Actividad antimicrobiana.....	31
7.10 Prueba de toxicidad.....	33
8. Conclusiones.....	36
9. Perspectivas.....	37
10. Bibliografía.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultado de alineamiento realizado en la base de datos ITS RefSeq Targeted Loci Project.....	19
Tabla 2. Comparación de medias (one-way ANOVA) para los diferentes medios de cultivo.....	23
Tabla 3. Comparación de medias (one-way ANOVA) para las diferentes condiciones de agitación.....	24
Tabla 4. Comparación de medias (one-way ANOVA) para las diferentes condiciones de pH.....	24
Tabla 5. Comparación de medias (one-way ANOVA) para los diferentes condiciones de presencia de Pb.....	25
Tabla 6. Cromatografía en capa fina, <i>R_f</i> e interpretación de la solubilidad y movilidad del pigmento.....	28
Tabla 7. Estabilidad de pigmento bajo diferentes condiciones ambientales.....	29
Tabla 8. Resultados esperados del análisis antimicrobiano para violeta de genciana.....	32
Tabla 9. Análisis de toxicidad del extracto pigmentado de <i>Talaromyces amestolkiae</i> con <i>Artemia salina</i>	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de metodología gral.....	17
Figura 2. Morfología de la cepa.....	18
Figura 3. Determinación de punto estacionario.....	20
Figura 4. Espectro de absorción máxima ($\lambda_{\text{máx}}$).....	21
Figura 5. Efecto de las condiciones de cultivo	26
Figura 6. Curva de calibración por abs relativa.....	27
Figura 7. Análisis antimicrobiano de difusión por disco.....	31
Figura 8. Análisis de toxicidad con <i>Artemia salina</i>	33

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AAS	<i>Atomic Absorption Spectrophotometry</i> (Espectrometría de absorción atómica)
AcOEt	Acetato de etilo
CBS	<i>Cystathionine-Beta-Synthase</i> (cistationina beta-sintetasa)
ϵ	Coefficiente de extinción
EtOH	Etanol
FT-IR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier)
IC	Intervalo de confianza
ITS	Internal Transcriber Spacer (Espaciador transcrito interno)
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima
LC_{50}	Concentración letal media
MH	<i>Mueller-Hinton Agar</i> (medio Mueller-Hinton)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
OD	<i>Optical Density</i> (Densidad Óptica)
p-valor	Valor de probabilidad estadística
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> (Agar Papa Dextrosa)
R^2	Medida estadística del ajuste de un modelo de regresión
R_f	<i>Retardation factor</i> (factor de retención en TLC)
Rpm	Revoluciones por minuto
<i>T. amestolkiae</i>	<i>Talaromyces amestolkiae</i>
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía de capa fina)
UA	Unidades de Absorbancia
UV-Vis	Espectroscopía ultravioleta-visible
YMB	<i>Yeast Malt Broth</i> (Caldo de extracto de levadura y malta)
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i> (Caldo levadura, peptona y dextrosa)

RESUMEN

Para cubrir la demanda de pigmentos naturales con diversos usos industriales (textiles, alimenticios, cosméticos, farmacéuticos, nutraceuticos), se ha considerado la bioprospección de agentes microbianos en condiciones de estrés ambiental pues estas condiciones extremas obligan al microorganismo a priorizar la síntesis de metabolitos secundarios con características únicas como estrategia adaptativa. El objetivo fue obtener un extracto pigmentado a partir de un hongo metalotolerante; evaluar su posible actividad antimicrobiana, no toxicidad y estabilidad a diferentes condiciones ambientales. Para ello, se caracterizó la cepa fúngica a partir de la descripción de su morfología y se confirmó su identidad como *Taralomyces amestolkiae* por secuenciación y análisis bioinformático con los marcadores moleculares ITS. Se evaluó la producción del pigmento de interés por espectrofotometría UV-Vis a λ 490 nm, a partir de una fermentación en estado sumergido por 7 d probando diferentes medios de cultivo (PDB, YMB y YPD), agitación (0 y 150 rpm), pH (5, 6 y 7) y concentración de plomo (0 y 50 ppm). Las mejores condiciones de cultivo para la producción del pigmento se obtuvieron en PDB a 150 rpm, pH 5, obteniendo un rendimiento de 6.84 g/L. El pigmento fue extraído con etanol 95% (1:2) y este fue sometido a diferentes pruebas de estabilidad, dando como resultado una termoestabilidad relativa de un 94.50%, estabilidad a pH (de 2-14) de más de 90%, a luz solar directa de 99.55%, a luz UV (350nm) de 88.15% y a presión de vapor (15psi) de 89.88%. Se realizó una serie de cromatografías de capa fina con diferentes fases móviles que destacaron un compuesto homogéneo con buena solubilidad en solventes polares y apolares, características anfifílicas como en el caso de pigmentos tipo azafilonas. Para el análisis de su capacidad antimicrobiana por método de difusión en disco (contra bacterias gram negativas y positivas) el extracto de pigmento no registró capacidad antimicrobiana contra las cepas probadas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*, en un rango de concentración de 2.5 a 20 mg/mL. En el análisis de toxicidad con *Artemia salina*, se obtuvo un LC_{50} de 2000.29 mg/L (IC de 95% entre 1307-3156 mg/L), lo que indicó ausencia de toxicidad. El aislamiento de nuevas cepas productoras y la caracterización de sus pigmentos son pasos clave para el desarrollo y aplicación biotecnológica potencial de estos compuestos.

ABSTRACT

To meet the growing demand for natural pigments with diverse industrial applications (textile, food, cosmetic, pharmaceutical, and nutraceutical), the bioprospecting of microbial agents under environmental stress conditions has been considered a promising strategy, as such extreme conditions drive microorganisms to prioritise the synthesis of secondary metabolites with unique characteristics as an adaptive mechanism. The aim of this work was to obtain a pigmented extract from a metal-tolerant fungus and to evaluate its possible antimicrobial activity, non-toxicity, and stability under different environmental conditions. The fungal strain was characterised based on its macro- and microscopic morphology, and its identity was confirmed as *Talaromyces amestolkiae* through sequencing and bioinformatic analysis using ITS molecular markers. Pigment production was evaluated by UV-Vis spectrophotometry at a wavelength of 490 nm, following a 7-day submerged fermentation under different conditions of culture medium (PDB, YMB, and YPD), agitation (0 and 150 rpm), pH (5, 6, and 7), and lead concentration (0 and 50 ppm). The optimal conditions for pigment production were obtained in PDB broth at 150 rpm, pH 5, and without lead, yielding 6.84 g/L. The pigment was extracted with 95% ethanol (1:2) and subjected to various stability tests, showing relative thermal stability of 94.50%, pH stability (2–14) above 90%, stability under direct sunlight of 99.55%, UV light (350 nm) of 88.15%, and vapour pressure (15 psi) of 89.88%. Thin-layer chromatography using different mobile phases revealed good solubility in both polar and non-polar solvents, consistent with the amphiphilic nature of azaphilone-type pigments. For antimicrobial activity analysis by the disc diffusion method (against Gram-positive and Gram-negative bacteria), the pigment extract showed no inhibitory activity against *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens*, and *Bacillus subtilis* at concentrations ranging from 2.5 to 20 mg/mL. The toxicity test using *Artemia salina* yielded an LC₅₀ value of 2000.29 mg/L with a 95% confidence interval of 1307–3156 mg/L, indicating that the extract is non-toxic. The isolation of new pigment-producing strains and the characterisation of their metabolites are key steps towards the biotechnological development and potential applications of these compounds.

I. INTRODUCCIÓN

Los pigmentos, también considerados colorantes en algunas aplicaciones, son compuestos con las características químicas necesarias para manifestar un color. En la actualidad, son empleados por numerosos sectores industriales, principalmente en el área de producción textil, farmacéutica, nutracéutica y en la industria alimenticia (Afroz-Toma *et al.* 2023).

En sus inicios, el origen de estos compuestos era en su mayoría a partir de fuentes naturales, pero conforme se incrementó la demanda y su uso se extendió a los diferentes ámbitos de nuestra vida diaria, las industrias se vieron en la necesidad de recurrir a los pigmentos sintetizados químicamente. Desafortunadamente, los colorantes sintéticos representan un riesgo para la salud pública, pues son elementos que contribuyen al desarrollo de enfermedades mentales, alergias y una variedad de neoplasias malignas (Bagy *et al.* 2023). La naturaleza siempre se ha considerado como una buena fuente de organismos productores de pigmentos, llamados biopigmentos por su origen orgánico, entre los que comprenden animales, plantas y microorganismos que ofrecen todo tipo de colorantes con diversas tonalidades y propiedades (Kalra *et al.* 2020). Algunos de estos compuestos no solo proveen color y características atractivas sino también son amigables con el medio ambiente e inocuos para la salud humana, por lo que son considerados seguros y pueden utilizarse en ámbitos que repercuten en la rutina diaria. De los más importantes se pueden destacar las antocianinas, carotenoides, betalainas, clorofilas y curcuminas.

Los pigmentos naturales han sido ampliamente estudiados y caracterizados por diferentes grupos de estudio a través del tiempo. Sin embargo, su potencial como fuente comercial de pigmentos es limitada por varios factores (Khan *et al.* 2021). Algunos de los retos que enfrenta la industria de los colorantes son la disponibilidad de materia prima para obtener pigmentos de animales, así como la inestabilidad climática y ubicación geográfica en el caso de las plantas, por lo que en los últimos años se ha optado por el empleo de microorganismos con potencial de producción de biopigmentos.

Las bacterias, algas y hongos filamentosos tienen muchas ventajas adicionales dentro del compendio de los productores de pigmentos naturales. Estos ofrecen una amplia

variedad de compuestos que tienen la capacidad de ser producidos por medio de sistemas eficientes y de costos relativamente bajos; por lo general presentan una mayor estabilidad bajo la influencia de factores fisicoquímicos como temperatura, pH y una mayor solubilidad; además de que los procesos de extracción suelen ser más sencillos, y por lo tanto, fácilmente escalables. Por esta razón se consideran a los ojos de diversas industrias como fuentes viables con una gran aplicación potencial (Zhou *et al.* 2023).

A partir de esta primicia, muchas especies de hongos han atraído especial atención por su capacidad de producir una amplia gama de pigmentos que muestran una alta estabilidad química ante factores como la luz y un gran rendimiento de producción. Hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Monascus* y *Trichoderma* son algunos de los productores de pigmentos más comunes y han sido reportados y estudiados por su capacidad de sintetizar estos metabolitos de manera dependiente a las condiciones establecidas durante su crecimiento (Valenzuela-Gloria *et al.* 2021).

Algunos de estos hongos han sido exitosamente empleados para producir y comercializar productos y aditivos naturales, como carotenoides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas y monascinas, como violaceína o índigo. Sin embargo, la demanda por parte del consumidor por sustituir pigmentos sintéticos potencialmente dañinos ha ido en aumento, así como la preferencia por su contraparte natural. Es por ello que se presenta como necesidad el incrementar la búsqueda de nuevas cepas que ofrezcan compuestos de interés y determinar el mejor sistema para producirlos para aprovechar sus beneficios en alguna de las diferentes áreas de aplicación (Pandey *et al.* 2018).

El presente trabajo tiene como finalidad la evaluación de una cepa productora de un pigmento (biopigmento) que fue aislada de condiciones de crecimiento particulares, la optimización de las características del medio de cultivo y el análisis del pigmento obtenido por medio de ensayos que determinarán el área de aplicación y su posible aplicación industrial.

II. ANTECEDENTES

2.1 Pigmentos

Se denomina pigmentos a las sustancias o materiales encargados de convertir en color por medio de la reflexión o absorción selectiva de un haz de luz según su longitud de onda. Están conformados por cromóforos, que son estructuras que permiten al compuesto absorber o reflejar la energía electrónica a una longitud de onda de luz determinada dentro del espectro ultravioleta visible (Lourenço-Lopes *et al.* 2021).

2.2 Pigmentos sintéticos

La historia de los agentes colorantes artificiales comenzó con la síntesis de mauveína por el señor William Henry Perkin en 1856 (Anugraha y Tomas, 2021) y en los dos siglos posteriores, la formulación de colorantes sintéticos ha ido en aumento.

Desafortunadamente efectos perjudiciales han sido ligados a colorantes alimenticios: déficit de atención/hiperactividad en niños, alergias, cáncer, desordenes reproductivos y deterioro neurológico (Lin y Xu, 2023). En el 2007, se definió por primera vez a los colorantes de “Southampton 6” como el factor más desencadenante de estas reacciones en humanos (Kalra *et al.* 2020). Estos pigmentos incluyen la tartrazina (E102), el amarillo quinoleína (E104), el amarillo anaranjado (E110), la carmoisina (E122), el rojo cochinilla 4R (E124) y rojo allura (E129).

2.3 Pigmentos naturales

Debido a estos serios problemas de seguridad por colorantes sintéticos artificiales, que se han utilizado ampliamente en industria alimenticia, cosmética y farmacéutica, existe un interés global en el desarrollo de procesos para la producción de colorantes naturales derivados de una gran variedad de fuentes biológicas ya que representan una fuente alternativa viable. Entre estos recursos explotables se encuentran las plantas, animales,

insectos y microorganismos (Gunasekaran y Poorniammal, 2008).

La demanda por colorantes naturales en el mercado tiene un crecimiento anual de 5.7% y una proyección estimada en alrededor 3,500 millones de dólares para el 2028, y va en aumento a tal grado que se requiere incrementar la búsqueda por más fuentes de pigmentos y mejorar los procesos de producción (Rengifo *et al.* 2023). Los microorganismos y las plantas son los mayores productores de pigmentos naturales, pero estas últimas presentan la desventaja de depender de la temporada, es decir, su desarrollo se verá limitado por factores como la disponibilidad de luz, calor y cambios de pH. Así mismo, los métodos de extracción y producción disponibles para este tipo de organismos son limitados por lo que podrían truncar su aplicación comercial potencial (Lebeau *et al.* 2017).

2.4 Pigmentos producidos por microorganismos

Los pigmentos naturales de origen microbiano, ya sea proveniente de algas, bacterias, hongos o protozoarios, ofrecen muchas ventajas sobre los pigmentos obtenidos a partir de animales y plantas. La principal razón es porque sus células son más pequeñas y sencillas en cuanto a organización genética, por lo que tienen una tasa de crecimiento mayor y son capaces de utilizar fuentes nutritivas mucho más simples y menos costosas. Asimismo, presentan por lo general un mayor rendimiento de producción de metabolitos, además de tener la capacidad de hacerlo sin depender de las condiciones ambientales o posición geográfica (Bagy *et al.* 2023).

Entre los pigmentos naturales más comunes se encuentran los carotenoides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas y monascinas, como violaceina o índigo (Rengifo *et al.* 2023). Estos son de suma importancia para los microorganismos que las producen pues constituyen un papel de gran significancia en diferentes respuestas adaptativas, en especial de protección (Narendrababu y Shishupala 2017).

2.5 Hongos productores de pigmentos

Los hongos representan el grupo de organismos del cual se han aprovechado más especies para producir pigmentos naturales. Estas especies pueden ser encontradas en ambientes con gran variedad de condiciones ambientales, siendo los sistemas biológicos terrestres, manglares y ambientes oceánicos las fuentes principales de organismos de crecimiento filamentoso (Afroz-Toma *et al.* 2023). La capacidad de síntesis del biopigmento por lo general se encuentra íntimamente ligada a la adaptación y supervivencia del microorganismo ante condiciones adversas o de estrés. Bajo estas circunstancias es cuando el hongo opta por atenuar o interrumpir las vías metabólicas energéticas de síntesis de metabolitos primarios, enfocadas en el crecimiento celular, y a su vez, orquesta la síntesis de metabolitos secundarios que le proporcionarán la posibilidad de supervivencia (Bagy *et al.* 2023).

Entre los principales géneros de especies que en reiteradas ocasiones se han reportado como productoras de pigmentos con potencial aplicación biotecnológica se encuentran *Aspergillus* (Palacio-Barrera *et al.* 2018), *Fusarium* (Manon-Mani *et al.* 2015), *Penicillium* (Chintapenta *et al.* 2014; Khan *et al.* 2021), *Monascus* (Babitha *et al.* 2007; Dikshit y Tallapragada, 2014), *Talaromyces* (Chadni *et al.* 2017; Ryu *et al.* 2017) y *Trichoderma* (Gupta *et al.* 2013), entre otros.

2.6 Pigmentos fúngicos

Los pigmentos fúngicos son de los metabolitos secundarios más comunes y juegan un rol subestimado, pero sin duda clave para la protección celular e interacciones ecológicas con otros organismos (Lin *et al.* 2023). Estos metabolitos secundarios se componen de estructuras muy diversas que les permiten mantener una mayor estabilidad a las variaciones de temperatura, cambios en el pH y solubilidad en el agua, así como la interacción con otros metabolitos y receptores (Lebeau *et al.* 2017). Los aspectos fisicoquímicos mencionados son los que les proporcionan a cada pigmento sus propiedades bioactivas características: se ha demostrado la efectividad de los pigmentos fúngicos en aplicaciones

sencillas como pigmentos textiles, cosméticos, aditivos y suplementos alimenticios, así como también diversas aplicaciones médicas del tipo farmacológico, antioxidante, anticancerígeno y antimicrobiano (Bagy *et al.* 2013); tratamientos contra la obesidad, reductores de colesterol y antiaterogénicos, contra el desarrollo de enfermedades como el Alzheimer y desordenes inmunosupresivos (Afroz-Toma *et al.* 2023).

Algunos ejemplos de estos compuestos producidos por hongos se pueden mencionar a los pertenecientes al grupo de los pigmentos carotenoides, como el β -caroteno (Kaur *et al.* 2019) y licopeno (Dufossé 2018); pigmentos tipo rubinas como el producido por los hongos de género *Monascus*, Monascorubina (Oliveira *et al.* 2019); y por último pero no menos importantes, los pigmentos derivados de la ruta biosintética de los policétidos, como Melanina (Oh *et al.* 2021) y las quinonas, como naftoquinonas (Nematollahi *et al.* 2012), antraquinonas (Caro *et al.* 2017) y benzoquinonas (Zheng *et al.* 2017).

2.7 Aplicaciones

En sus inicios, la aplicación de pigmentos de origen fúngico se centró en el diseño de productos para el área de alimentos (Poorniammal *et al.* 2021), textiles (Venil *et al.* 2020), cosméticos (Meruvu y Dos Santos, 2021) y suplementos (Bagy *et al.* 2023). Sin embargo, las últimas tendencias señalan el incremento de estudios para la aplicación de estos metabolitos en las industrias agroquímicas y farmacéuticas, aunque estas aplicaciones dependerán, además de las características y estabilidad del pigmento, de los avances en dispositivos de fermentación, o biorreactores, así como en las etapas del *downstream processing* requeridas y el desarrollo de sistemas fácilmente manipulables en el laboratorio, pues sólo una pequeña parte de todos los estudios con colorantes han podido escalar industrialmente y posicionarse en el mercado (Lin y Xu 2023).

Por ejemplo, desde el 2003 la compañía española Vitatene (ahora DSM) comenzó la manufactura de licopeno a partir del hongo *Blakeslea trispora* para suplir al mercado europeo (Padhi *et al.* 2019). En especial, enfocada a la industria de alimentos, que es el área que requiere mayor abastecimiento de pigmentos naturales a nivel comercial.

Normalmente los pigmentos en esta industria se emplean para mejorar el color, sabor, aroma y calidad nutricional de los alimentos. Muchos pigmentos sintéticos han sido reemplazados por los producidos biotecnológicamente pues los primeros presentaban características teratogénicas, tóxicas y carcinogénicas. Los pigmentos fúngicos que se usan en las industrias de alimentos hoy en día son pigmentos carotenoides y tipo *Monascus* los únicos que se utilizan en estas industrias. (Zhou *et al.* 2023).

2.8 Hongos extremófilos productores de pigmentos

En un principio, se buscaron hongos terrestres en sitios arbitrarios con la finalidad de extraer compuestos bioactivos de interés, pero conforme se fue avanzando en estas exploraciones, se formó la idea de que los hábitats extremos actúan como un sitio valioso para el aislamiento de especies productoras de nuevos compuestos bioactivos: cuando hay una elevación de la temperatura, alta presión osmótica o un compuesto en el medio en altas concentraciones de algún compuesto, los microorganismos tienden a darle prioridad a la síntesis de metabolitos secundarios sobre los metabolitos primarios, lo que constituye una estrategia adaptativa que favorece la supervivencia, mientras se ahorran recursos y compuestos para reanudar el crecimiento una vez las condiciones favorables se restablezcan (Babitha *et al.* 2007). Por esta razón, se ha sugerido que el establecimiento exitoso de un hongo en un ambiente de estrés ocurre gracias a la producción de metabolitos secundarios únicos, los cuales tienen un uso potencial en industrias comerciales (Jancic *et al.* 2016).

Un ejemplo de este tipo de adaptación es el reportado por Kogej y colaboradores (Kogej *et al.* 2004), en la que se demostró la síntesis de melanina en dos especies de hongos, *Trimmatostroma salinum* y *Phaeotheca triagularis*, aisladas del ambiente hipersalino de la costa oriental del Mar Adriático. Esto gracias a un suministro de cloruro de sodio saturado. También, se encontró que un hongo que habita en el desierto antártico, *Cryomyces antarticus*, produce melanina con una resistencia a altas dosis de radiación. Colectivamente, estos hongos extremófilos son reconocidos como fuentes prometedoras

con propiedades fisicoquímicas deseables para aplicaciones industriales y médicas (Lin y Xu 2023).

De igual manera, una especie del género *Fusarium* aislado de un área contaminada por industrias acereras permitió obtener un biopigmento con alta capacidad antioxidante (Manon-Mani *et al.* 2015); un hongo *Penicillium* criotolerante aislado de la región del Himalaya produjo un pigmento naranja soluble que es una mezcla de diferentes carotenoides con actividad microbiana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y actinos (Pandey *et al.* 2018). Así mismo, alterando la concentración de sales en el medio de cultivo, un hongo aislado de un ambiente marino, *Talaromyces albobiverticillius*, produce pigmento en un rango dinámico de coloración, por lo que se demostró que el estrés abiótico tiene un impacto importante en el metaboloma de estas especies halotolerantes (Verkantachalam *et al.* 2019). Por todos los ejemplos anteriores, se sugiere no solo que diferentes condiciones alteran la biosíntesis de pigmentos y otros metabolitos secundarios, sino que ciertos hábitats inusuales son una buena opción para investigar hongos que puedan producir nuevos compuestos bioactivos de interés.

III. JUSTIFICACIÓN

La sustitución de pigmentos sintéticos por parte de las industrias alimenticias, textiles y cosméticas ha pasado de ser una tendencia a representar una necesidad de limitar el continuo riesgo por el consumo y exposición a estos compuestos desde el punto de vista del mejoramiento de la calidad y salubridad humana. En especial, si el uso de pigmentos naturales trae consigo beneficios adicionales aplicables a las industrias farmacéuticas, nutraceuticas y agroquímicas. Se ha demostrado que el planteamiento de producción de pigmentos de origen fúngico es altamente viable, pues evade la problemática de la falta de materia prima de los pigmentos derivados de animales, las condiciones climáticas y geográficas poco favorables que puede presentar la biosíntesis de pigmentos vegetales, y promete un mayor rendimiento y diversidad de metabolitos -por su naturaleza eucariota- que su contraparte bacteriana. Sin embargo, la extracción de pigmentos derivados de hongos es un área tan prometedora como poco estudiada, por lo que el aislamiento de cepas a partir de un ambiente de estrés, como lo es un sitio contaminado por metales pesados -aunado a la elección de condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo, protocolos de extracción de bajo costo e impacto ambiental, y diseño sencillo pero de calidad para las etapas del procesamiento *downstream*- supone un buen comienzo para lo que podría ser la obtención de un pigmento bioactivo de potencial interés para la industria.

IV. HIPÓTESIS

La cepa fúngica metalotolerante aislada de un sitio altamente contaminado con metales pesados es capaz de producir un pigmento el cual presenta actividad antimicrobiana, no tóxico y estable a diferentes condiciones ambientales.

V. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Obtener un pigmento a partir de un hongo filamentoso aislado de un sitio altamente contaminado con metales pesados, con actividad antimicrobiana, no toxicidad y estable a diferentes condiciones ambientales.

5.2 Objetivos particulares

- Caracterizar morfológicamente el hongo para obtener su posible clasificación taxonómica hasta el nivel de género.
- Identificar molecularmente el hongo.
- Evaluar diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción del pigmento.
- Caracterizar químicamente el pigmento.
- Evaluar la estabilidad del pigmento a diferentes condiciones ambientales.
- Evaluar la posible actividad antimicrobiana y toxicidad del pigmento.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Reactivación de la cepa metalotolerante

La cepa fúngica fue previamente aislada de un ducto de desecho de un espectrofotómetro de absorción atómica (modelo Varian SpectrAA 220FS) contaminado con metales pesados, mayoritariamente plomo. El hongo fue almacenado en un tubo de agar inclinado de PDA a 4°C en el cepario del L1 (Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en San Nicolás de los Garza, Nuevo León) a partir del cual fue reactivado. En condiciones de esterilidad, se inoculó por estría en ángulo recto para producir una esfera de desarrollo en cajas Petri con 20 mL de medio fresco PDA. Se sembró por triplicado y se llevó a incubación en oscuridad a 30°C por 14 d. A partir del crecimiento en estas cajas, se sembraron cajas nuevas hasta alcanzar la total reactivación del hongo, determinada por la presencia de micelio esporulado abundante cubriendo la superficie de la caja y pigmento rojizo en el lado anverso.

6.2 Caracterización morfológica

Se realizó la descripción morfológica macroscópica a partir de la observación del micelio en placa, y microscópica, por medio de la preparación de microcultivos (Barnett y Hunter, 1972; Raper *et al.* 1949). Se tomaron en cuenta: el color de la colonia, tamaño del micelio, producción de esporas, color o presencia de pigmento en el medio; la forma de la hifa, si está septada, el conidióforo, forma de las esporas o conidios.

6.3 Identificación molecular

La identificación molecular fue realizada por el Laboratorio de Servicios Genómicos (LabSerGen) de la Unidad de Genómica Avanzada, Cinvestav. Se extrajo ADN genómico directamente del cultivo en agar sólido, se amplificó la región ITS1-ITS2 mediante PCR y se realizó la secuenciación bidireccional por la técnica de Sanger. Se utilizó la base de datos

Internal transcribed spacer region (ITS) from Fungi type and reference material para la identificación del género y especie.

6.4 Determinación de punto estacionario

Por triplicado, placas Petri con medio PDA se inocularon a partir de un cultivo de 7 d con asa recta esterilizada bajo la flama. Se inoculó con el asa cargada en un punto al centro del medio y se llevó a incubación a 30°C por 15 d. Se monitoreó el diámetro de la colonia diariamente.

6.5 Obtención de extracto pigmentado

A partir de un cultivo en medio líquido, se llevó a cabo la metodología de extracción con etanol (1:2) establecida en Anugraha y Thomas (2021): al matraz con cultivo pigmentado se le agregó el 60% del volumen total de etanol al 95% v/v. El matraz se llevó al agitador orbital por 30 min a 180rpm. Posteriormente se centrifugó (Eppendorf 5430 R) a 3780 rpm por 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. A este se le agregó el resto (40% del volumen total) de etanol al 95% v/v y se centrifugó una vez más a 3780 rpm por 5 min. El sobrenadante se volvió a recuperar y se filtró con papel filtro de poro medio (4 μ m) para ajustarlo a la concentración deseada por medio de evaporación indirecta del solvente por calentamiento a baño maría bajo agitación constante (~ 60°C).

6.6 Determinación del punto de absorbancia máxima (λ_{max})

El extracto pigmentado fue analizado mediante un barrido espectral utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (SmartSpecTM 3000, Bio-Rad). Se registraron lecturas de absorbancia en el rango de 400 a 550 nm de acuerdo con la metodología propuesta por múltiples autores (Elakttaapy, Velmacharan, Dikshit, Chadny). Con los valores obtenidos se construyó una curva de absorbancia frente a longitud de onda, a partir de la cual se identificó el punto de absorbancia máxima (λ_{max}), valor que fue empleado para la cuantificación indirecta del pigmento en los diferentes tratamientos evaluados.

6.7 Evaluación de condiciones de cultivo para la producción de pigmento

Con el fin de optimizar las condiciones de producción del pigmento, se empleó un diseño experimental univariante secuencial (OFAT, One Factor At a Time). Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio inoculados con 1 mL de suspensión de esporas 1×10^6 esporas/mL. Primeramente, se probaron tres medios de cultivo: PDB (Potato Dextrose Broth) a pH 5.5, YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) a pH 6.5 y YMB (Yeast Malt Broth) a pH 4.5. Posteriormente, y tomando como partida el medio con mejores resultados, se evaluó sobre este el efecto de la agitación, comparando 0 y 150 rpm. Una vez más bajo la condición más prometedora, se evaluaron tres condiciones de pH, 5, 6 y 7. Finalmente, y al tratarse de una cepa metalotolerante, se comparó la ausencia y presencia de plomo (0 y 50 ppm) en el medio. Para la inoculación de los distintos medios de cultivo líquidos, se preparó una suspensión de esporas ajustada a 1×10^6 esporas/mL, siguiendo el método descrito por Verkatachalam y colaboradores (2019). Los resultados fueron monitoreados después de 7 d de incubación a 30°C. Cada cultivo se centrifugó a 3780 rpm por 15 min y se filtró con papel filtro de poro medio (4 μ m) para retirar el micelio. Se midió la longitud de onda de este extracto en el espectrofotómetro de luz UV-Vis a 490 nm. La biomasa recolectada fue colocada en círculos de papel filtro (pre-pesado), secada en horno a 24°C por 24 h (Thermolyne Furnace 6000) y se pesó en balanza analítica de precisión para la determinación de la biomasa seca.

6.8 Rendimiento

Se determinó el rendimiento en función al volumen a partir del extracto en etanol (1:2) del cultivo bajo condiciones óptimas (PDB a pH 5, agitación continua de 150 rpm por 7 d), se realizó una evaporación indirecta del solvente por calentamiento a baño maría bajo agitación constante ($\sim 60^\circ\text{C}$) y posterior secado en horno a 24°C por 24 h hasta obtener el pigmento seco. Este se resuspendió en etanol 95% a concentraciones conocidas y se midió su absorbancia mediante espectrofotometría UV-Vis. Con los valores obtenidos se construyó una curva de calibración basada en la absorbancia relativa, utilizada posteriormente para la cuantificación del pigmento en las distintas muestras.

6.9 Cromatografía en capa fina (TLC)

El extracto pigmentado se analizó mediante cromatografía en capa fina utilizando placas de sílica gel como fase estacionaria. Se probaron distintas fases móviles: etanol puro, acetona:etanol (7:3), acetona y acetato de etilo. El extracto se preparó en etanol 95% (1:2) y se aplicó sobre la placa junto con controles: medio sin inocular, etanol y agua destilada. Las placas se revelaron bajo luz UV a 254 nm, y se calcularon los valores de R_f correspondientes para cada fase móvil, con el fin de caracterizar la solubilidad y movilidad del pigmento.

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el soluto}}{\text{distancia recorrida por la fase móvil}}$$

6.10 Análisis de estabilidad

Se colocaron por triplicado 10 mL del extracto de pigmento en tubos de ensayo de vidrio con rosca midiendo la absorbancia con espectrofotómetro de UV-Visible a 490 nm antes y después del tratamiento para calcular el porcentaje de estabilidad de la siguiente manera (Velmuguran *et al.* 2011):

$$\text{Porcentaje de Estabilidad} = \left(\frac{\text{Abs final}}{\text{Abs inicial}} \right) \times 100$$

Para el ensayo de termoestabilidad, se llevaron los tubos con el extracto a una temperatura de 121°C por 20 minutos. Para el ensayo de estabilidad al pH, se ajustó el pH de 2-14 en agitación y se midió la absorbancia posterior a los 10 min. La estabilidad bajo la luz solar directa se evaluó a las 2 h de exposición. Para probar la estabilidad a luz UV se midió la absorbancia después de exponer el extracto a luz UV-A (350 nm) por 12 h. Finalmente, para la estabilidad a presión de vapor se aplicaron 15 psi por 20 minutos.

6.11 Prueba antimicrobiana

Siguiendo la metodología de Pandey y colaboradores: se utilizaron placas Petri con medio Mueller Hinton. Se sembraron por extensión bacterias Gram (+) y Gram (-) del cepario del L1: *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Se colocaron discos de difusión de 5mm de papel filtro de poro medio (4µm) esterilizados, impregnados con 20µL del extracto pigmentado a concentraciones de 2.5, 5, 10 y 20 mg/mL. Se usó etanol 95% (1:2) como control negativo y cristal violeta (violeta de genciana) a 10 mg/mL (Al-Khikani y Ayit, 2022) como control positivo. Se llevaron las placas a incubación por 24 h a 37°C y se determinó la zona de inhibición (Pandey *et al.* 2018).

6.12 Prueba de toxicidad

Quistes de *Artemia salina* fueron incubados a partir de una mezcla comercial que incluye quistes con un 90% de eclosión (230,000 npg, origen GSL, Utah) y sal especial para eclosión, con minerales añadidos como calcio y magnesio. Esta mezcla fue utilizada según las instrucciones del fabricante, sin oxigenación adicional. Las *Artemias* eclosionadas a las 24h se separaron cuidadosamente del medio de eclosión antes de su uso en las pruebas de toxicidad. Se prepararon soluciones con salinidad de 3.5% y pH 8 a cuatro concentraciones (10, 100, 1000 y 10000 mg/L) de pigmento, como control positivo violeta de genciana a 10 µL/mL (Himri *et al.* 2013) y como control negativo la solución de salmuera a pH 8. En dos placas de 12 pocillos se colocaron 3mL de solución y 10 nauplios por pocillo. Se llevó a incubación por 24 horas a 28°C. La tasa de mortalidad de *Artemia* fue analizada mediante el método de probabilidad ponderada (análisis PROBIT), según el modelo propuesto por Bliss (1934). Esta técnica permitió calcular la concentración letal media (LC_{50}) y su intervalo de confianza al 95% utilizando el software estadístico SPSS versión 26 (Zhou *et al.* 2023).

6.13 Análisis estadístico

Cada experimento fue realizado en tres repeticiones independientes, con un total de tres experimentos por condición experimental. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza de un factor (One-way ANOVA) para comparar las diferentes condiciones experimentales (por ejemplo, tratamientos con diferentes solventes o concentraciones de pigmentos). Para identificar diferencias significativas entre los grupos, se utilizó la prueba post-hoc de Tukey. El análisis estadístico fue realizado utilizando SPSS versión 26, con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

En la figura 1 se esquematiza el proceso completo de la metodología realizada en este estudio.

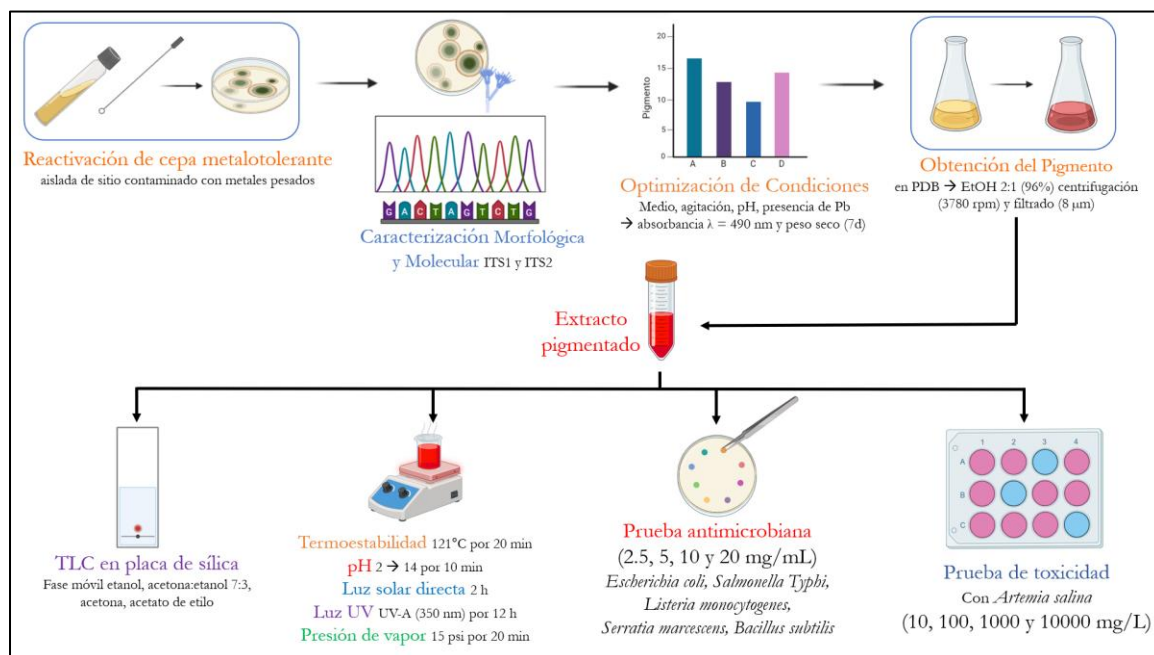


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología general

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Caracterización morfológica del hongo

La figura 2 representa la morfología de la cepa en medio PDA y morfología microscópica al día 7 de su crecimiento. El hongo presenta colonias laxamente funiculosas, bajas, elevadas al centro, márgenes abiertos. Micelio blanquecino y esporulación de moderada a densa, color verde-grisáceo (Figura 2A). Pigmentación anaranjada-roja por el reverso del cultivo (Figura 2B). Bajo un aumento de 40x, se observaron conidióforos biverticiliados, ramificaciones subterminales presentes en las hifas, y métulas en los verticilios. Conidios lisos, algunos rugosos, elipsoidales (Figura 2C). Esta descripción reúne rasgos característicos compatibles con los géneros *Penicillium* y *Talaromyces*, géneros del filo Ascomycota. *Talaromyces* fue anteriormente clasificado como la fase sexual de algunas especies de *Penicillium* (Yilmaz *et al.* 2012).

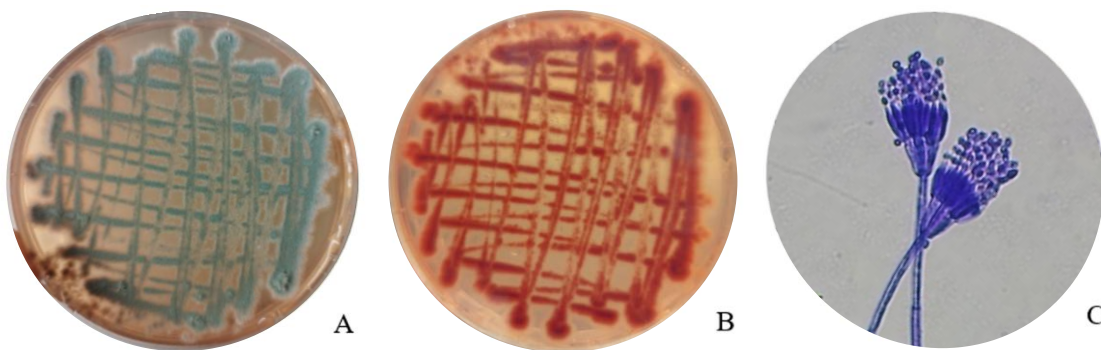


Figura 2. Morfología de la cepa *T. amestolkiae* asilada a partir del ducto de desechos del espectro de absorción atómica. **A.** Vista anversa y **B.** vista reversa de la morfología macroscópica. **C.** Morfología microscópica a 40x.

7.2 Identificación molecular

En la tabla 1 se presentan los resultados de la identificación molecular obtenida a partir del análisis taxonómico de las regiones entre el 18S-5.8S de las secuencias de la subunidad ribosómica, ITS1, y la región entre el 5.8S-28S, ITS2. Se obtuvo una coincidencia del 99.64% de identidad con la secuencia de la región ITS reportada para el hongo *Talaromyces amestolkiae* CBS 132696 (accession: NR_120179.1) en el alineamiento realizado con la base de datos ITS RefSeq Targeted Loci Project (Raja *et al.* 2017).

Tabla 1. Resultado del alineamiento realizado en la base de datos ITS RefSeq Targeted Loci Project

Descripción	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Indent	Acc. Len	Accession
<i>Talaromyces amestolkiae</i> CBS 132696 ITS region; from TYPE material	1024	1024	96%	0.0	99.64%	577	NR_120179.1

Estas características apoyan la descripción morfológica antes realizada, confirmando la identidad de la cepa. *Talaromyces amestolkiae* se ha delimitado y reportado por Yilmaz y colaboradores (2012) y se documenta que este hongo produce diferentes metabolitos secundarios como ácido berkélico, mitorrubrina, ácido mitorrubrínico, mitorrubrinol, pigmentos rojos tipo azafilona similares a los de *Monascus*, pestalacina A, una purpactina y vermicelina.

En este estudio nos enfocamos en el compuesto pigmentado tipo *Monascus* del grupo de azafilonas. Este puede presentar características antimicrobianas, antifúngicas, antivirales, antioxidantes, citotóxicas, nematocidas y anti-inflamatorias (Yilmaz *et al.* 2014).

7.3 Determinación del punto estacionario

La gráfica de la figura 3 muestra el crecimiento micelial de la cepa fúngica metalotolerante en medio PDA durante 15 d de incubación. Tras la reactivación, y una vez que la cepa recuperó su crecimiento activo y mostró desarrollo vegetativo normal, se observó una fase exponencial del crecimiento micelial que se estabilizó a partir del día 7 con un diámetro promedio de 4.3 cm, indicando que el hongo entró en fase estacionaria.

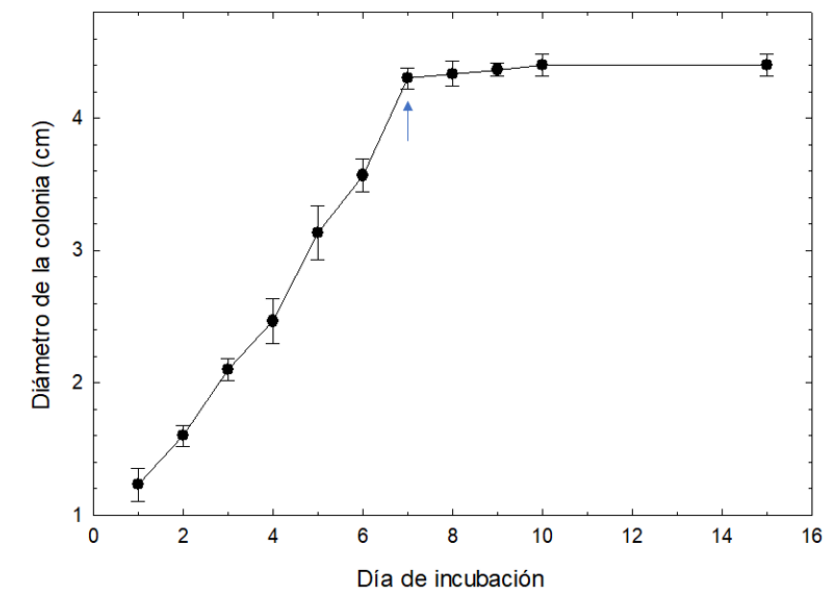


Figura 3. Determinación del punto estacionario de crecimiento micelial en medio sólido. La flecha indica el crecimiento en el día en que se alcanzó el punto estacionario.

El periodo de incubación para *Talaromyces amestolkiae* puede variar dependiendo de factores como la cepa específica y las condiciones de crecimiento, pero generalmente toma entre 5-7 d para que haya crecimiento visible colonial en una placa a 30°C (Villanueva-Lozano *et al.* 2017; Zaccarim *et al.* 2019). El conocimiento del punto estacionario permitió seleccionar el tiempo óptimo para la recolección del micelio en condiciones estables, minimizando variaciones fisiológicas entre réplicas y asegurando comparabilidad en los análisis posteriores.

7.4 Determinación del punto de absorbancia máxima ($\lambda_{\text{máx}}$)

En la figura 4 se esquematizan los espectros de absorción obtenidos a partir de cultivos independientes de *T. amestolkiae* metalotolerante. Cada línea representa un cultivo distinto ($n = 3$). Se observó un pico consistente alrededor de los 490 nm, identificado como la longitud de onda de absorción máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) del pigmento. Esta longitud fue utilizada en los análisis posteriores de cuantificación y estabilidad y coincide con la $\lambda_{\text{máx}}$ reportada por Elattaapy y Selim (2020) a partir de un análisis espectrofotométrico a cinco puntos, y la longitud de onda para pigmento rojo que emplean Zaccarim y colaboradores (2019) en sus análisis de pigmento con *Talaromyces amestolkiae*.

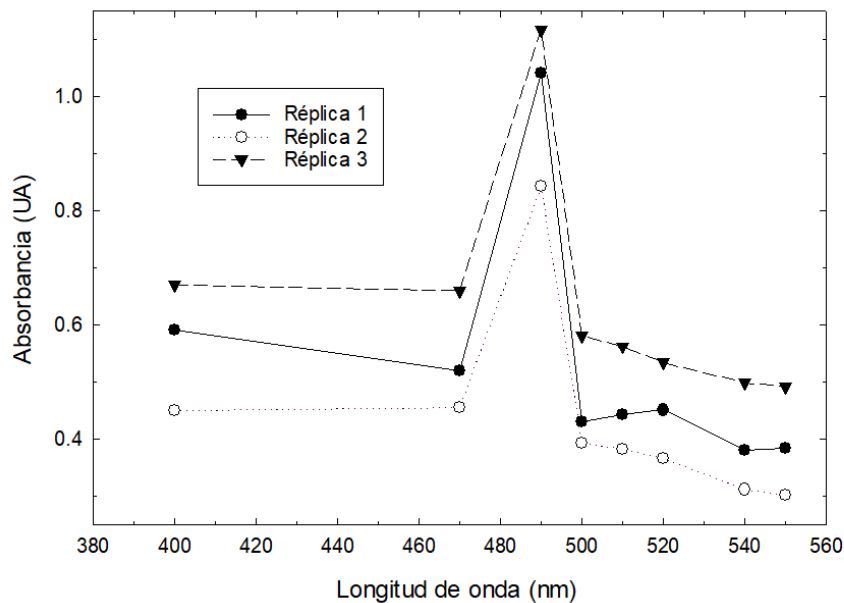


Figura 4. Espectros de absorción de extractos de pigmento obtenidos de cultivos independientes de *T. amestolkiae*.

En este estudio, la cepa de *Talaromyces amestolkiae* produce pigmento detectable en el medio de cultivo, sin requerir lisis celular para su extracción. Es decir, la mayor parte del metabolito de interés es extracelular bajo las condiciones ensayadas, dato que contrasta con lo presentado en la literatura donde se menciona que la azafilona tipo *Monascus* no se

difunde en el agar (Yilmaz *et al.* 2014). La producción predominante de pigmento extracelular observada podría estar asociada con la adaptación de la cepa a condiciones de estrés ambiental, lo que favorecería la secreción de metabolitos secundarios como estrategia de supervivencia. Este comportamiento es ventajoso desde un punto de vista biotecnológico, ya que facilita la extracción y purificación del pigmento en comparación con metabolitos intracelulares, como se ha reportado en otros estudios con esta especie (Morales-Oyervides *et al.* 2017; Oliveira *et al.* 2020).

7.5 Evaluación de condiciones de cultivo para la producción de pigmento

Se evaluó la producción de pigmento a partir de la medición de la absorbancia a una $\lambda = 490$ nm y el crecimiento de la biomasa por peso seco a los 7d de incubación. Primeramente, como se describe en la Tabla 2, se obtuvo una mayor cantidad de biomasa con el medio YPD (42.6 ± 4.9 g/mL) con valores estadísticamente significativos a comparación de los medios PDB (22.33 ± 0.5 g/mL) y YMB (15 ± 1.7 g/mL). Sin embargo, se obtuvo que el medio PDB produce significativamente una mayor cantidad de pigmento (0.614 ± 0.07 UA₄₉₀) en contraste con los medios YMB (0.222 ± 0.05 UA₄₉₀) y YPD (0.450 ± 0.02 UA₄₉₀) por lo que se determinó al PDB como la mejor opción para producción de pigmento (Figura 5a). El medio PDB, en específico el almidón de papa de su composición, puede tener iones metálicos u otros micronutrientes apropiados para que las enzimas funcionen efectivamente e incrementen la producción de metabolitos y pigmentos (Pradeep *et al.* 2013).

Tabla 2. Comparación de medias de un factor (one-way ANOVA), estimación de pigmento y peso seco de la biomasa obtenida, para los diferentes medios de cultivo.

Medio	PDB	YMB	YPD	p-valor
UA (490nm)	$0.614 \pm 0.07a$	$0.222 \pm 0.05b$	$0.450 \pm 0.02c$	0.000
Biomasa (g/mL)	$22.33 \pm 0.5a$	$15 \pm 1.7a$	$42.6 \pm 4.9b$	0.000

Así mismo, se obtuvieron mejores resultados con diferencia significativa para la estimación de la producción de pigmento en condiciones de 150 rpm de agitación (0.614 ± 0.07 UA₄₉₀) que en cultivo estático (0.147 ± 0.03 UA₄₉₀). La producción de biomasa no arrojó diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3). Se ha reportado que el estímulo mecánico en fermentaciones sumergidas mejora la transferencia de oxígeno, distribución de nutrientes y en general asegura la homogeneidad en las condiciones (Gunasekaran y Poorniammal 2008). Así mismo, Morales y colaboradores (2017) analizando la velocidad de agitación para la producción de pigmento en hongos,

concluyeron que una agitación de 150 rpm resulta óptima para el cultivo sumergido, especialmente para pigmento extracelular: más agitación rompe el micelio y menos agitación limita la transferencia de oxígeno al cultivo. Este factor es importante pues guarda correlación directa con la tasa de transferencia de oxígeno (Figura 5b).

Tabla 3. Comparación de medias de un factor (one-way ANOVA), estimación de pigmento y peso seco de la biomasa obtenida, para las diferentes condiciones de agitación.

Agitación	Estático	150 rpm	p-valor
UA (490nm)	0.147±0.03a	0.614±0.07b	0.000
Biomasa (g/mL)	8.2±0.53a	22.33±0.5a	0.000

En cuanto al pH, se observó que el incremento substancial de este índice disminuye la absorbancia (pH 5, 0.744±0.05 UA₄₉₀; pH 6, 0.552±0.07 UA₄₉₀; pH 7, 0.435±0.02 UA₄₉₀), con una diferencia significativa entre el pH 5 y el pH 6 y 7 (Tabla 4). Esto puede deberse a que el pH repercute en la actividad enzimática involucrada en la biosíntesis de pigmentos: entre más se aleje el cultivo de condiciones óptimas de crecimiento, el microorganismo entrará en estado de estrés, lo que ocasiona que el metabolismo dé prioridad a las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios para asegurar la supervivencia (Zaccarim *et al.* 2019). De manera contraria, se observó un aumento del crecimiento de la biomasa conforme se incrementa el pH, pues el organismo se desarrolla mejor en condiciones óptimas, más resulta indirectamente proporcional a la producción de metabolitos secundarios (Figura 5c).

Tabla 4. Comparación de medias de un factor (one-way ANOVA), estimación de pigmento y peso seco de la biomasa obtenida, para las diferentes condiciones de pH.

pH	5	6	7	p-valor
UA(490nm)	0.744±0.05a	0.552±0.07b	0.435±0.02b	0.001
Biomasa (g/mL)	18.4±0.2a	22.07±0.97b	22.63±0.78b	0.001

Finalmente, la presencia de plomo en el medio promovió considerablemente el crecimiento de la biomasa (de 18.4 ± 0.2 g/L a 25.33 ± 3.5 g/L) mientras que se obtuvo una mayor estimación de pigmento en condiciones sin plomo en el medio que con 50 ppm (0.744 ± 0.05 UA₄₉₀ y 0.719 ± 0.01 UA₄₉₀ respectivamente) (Tabla 5). No obstante, este incremento no resultó estadísticamente significativo por lo que se optó por no añadir metal al medio para optimizar la producción de pigmento (Figura 5d). Cabe mencionar que los metabolitos secundarios suelen producirse en condiciones de estrés, como cuando los recursos son escasos, o bajo condiciones que no favorecen el crecimiento, sino que activan mecanismos de defensa o competencia, por lo que se esperaría ver un incremento en la producción del pigmento. Sin embargo, el crecimiento celular incrementado en presencia del metal sugiere que el plomo ya no resulta tóxico para esta cepa, sino que posiblemente lo ha integrado en su metabolismo de una forma adaptativa, por lo que estas condiciones se volvieron favorables para esta cepa y por lo tanto no activa estos sistemas secundarios (De Menezes *et al.* 2023). Los resultados obtenidos permiten plantear esta hipótesis, no obstante, se requieren estudios adicionales para esclarecer el papel que desempeña este metal en el metabolismo de *T. amestolkiae*, su impacto en la fisiología y producción de metabolitos secundarios.

Tabla 5. Comparación de medias de un factor (one-way ANOVA), estimación de pigmento y peso seco de la biomasa obtenida, para las diferentes condiciones de presencia de Pb.

Presencia Pb	Sin Pb	50 ppm Pb	p-valor
UA(490nm)	$0.744 \pm 0.05a$	$0.719 \pm 0.01a$	0.438
Biomasa (g/mL)	$18.4 \pm 0.2a$	$25.33 \pm 3.5a$	0.027

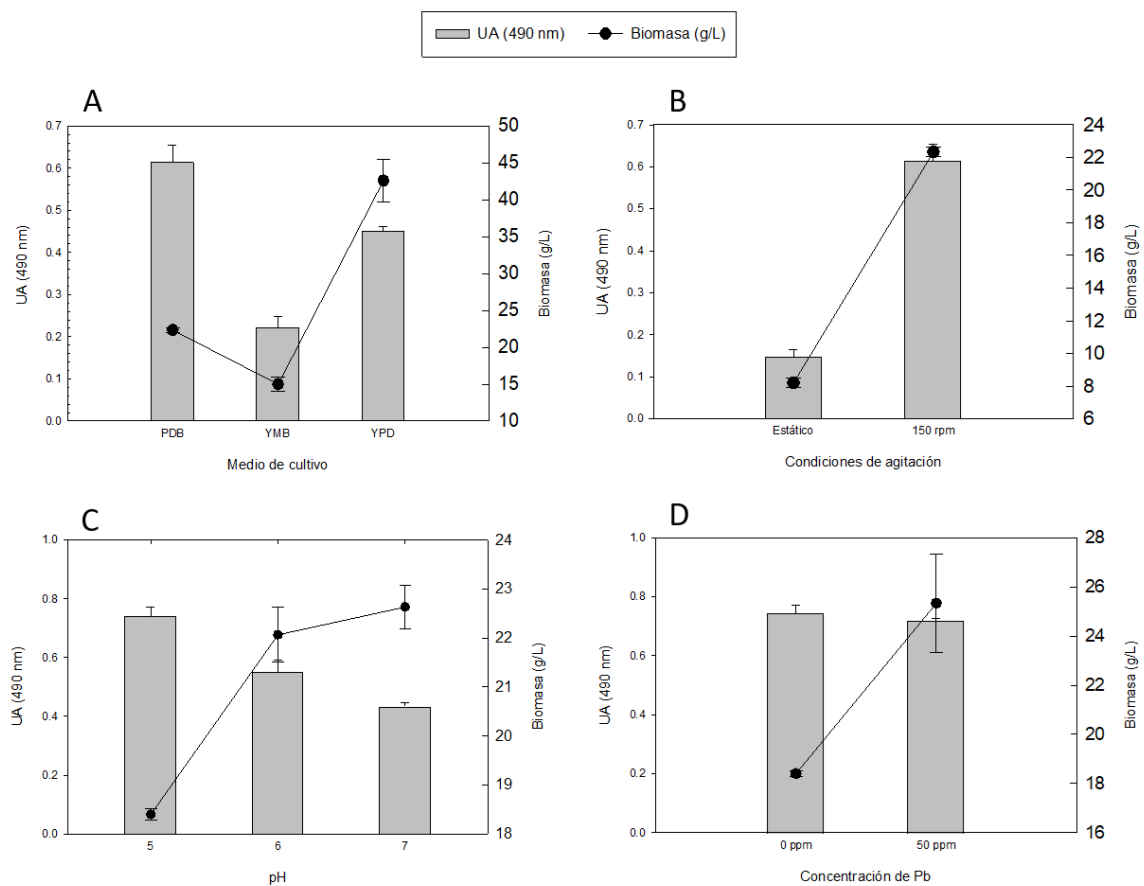


Figura 5. Efecto del medio de cultivo (A), condiciones de agitación (B), pH (C) y concentración de plomo (D) en la producción del pigmento y crecimiento de *T. amestolkiae*.

Los valores optimizados de producción para pigmento (0.744 ± 0.05 UA₄₉₀) y biomasa (18.4 ± 0.2 g/L) en medio PDB, con agitación de 150 rpm y un pH ajustado a 5, superan algunos encontrados en la literatura tanto para otras cepas de *Talaromyces amestolkiae* (0.510 UA₄₉₀ y 13.77 g/L) como para otras especies de hongos taxonómicamente relacionadas (en *Monascus purpureus*, 0.342 UA₄₉₀ y 29.2 g/L; *Penicillium sp.*, 0.432 UA₄₉₀ y 9.58 g/L) en condiciones de cultivo, agitación y pH similares (Zaccarim *et al.* 2019; Dikshit y Tallapragada 2014; Elattaapy y Selim 2020).

7.6 Rendimiento

En la figura 6 se grafica una curva de calibración por absorbancia relativa de extracto de pigmento a 490 nm. Esta se construyó a partir de la calibración de la absorbancia frente a la concentración (0.125 – 1 mg/mL), que mostró una relación lineal descrita por la ecuación $A = 2.0634c + 0.0872$ ($R^2 \approx 0.9992$). A partir de la pendiente de esta curva, y al no conocer la identidad de la molécula para obtener su coeficiente de extinción molar, se calculó el coeficiente de extinción relativo para el extracto como $\epsilon = 2.06$ (mg/mL) a $\lambda 490$, usando cubetas de 1 cm de camino óptico. Este valor permitió estimar la concentración del pigmento en otras soluciones a partir de su absorbancia a 490 nm.

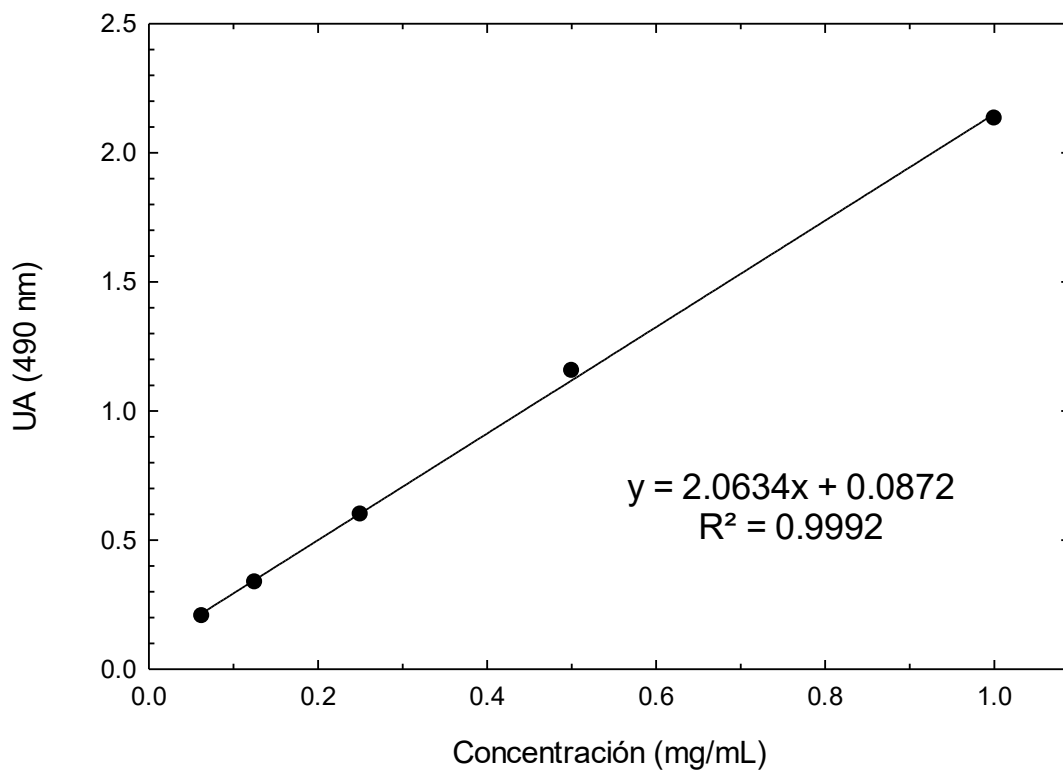


Figura 6. Curva de calibración por absorbancia relativa de extracto de pigmento.

A partir del extracto seco obtenido de 50 mL de medio de cultivo PDB se determinó un contenido de 0.342 g de pigmento. Al extrapolar el valor, se estimó un rendimiento de 6.84 g/L. Este valor es consistente con lo reportado para especies afines a *Talaromyces* (Zaccarim *et al.* 2019; Dikshit y Tallapragada 2014; Elattaapy y Selim 2020) y sugiere que la producción de pigmento podría ser viable para aplicaciones a mayor escala.

7.7 Cromatografía en capa fina (TLC)

Como parte del proceso de separación y caracterización inicial del extracto pigmentado, se tomó en cuenta un diseño exploratorio, realizando ensayos preliminares de cromatografía en capa fina (TLC) con el objetivo de evaluar la polaridad relativa y el posible número de compuestos presentes en el extracto. De las distintas combinaciones probadas, se destacaron cuatro fases móviles con polaridad creciente (Acetato de etilo → Acetona → Acetona:Etanol 7:3 → Etanol puro) que permitieron una visualización clara de manchas, a partir de las cuales se calcularon los valores de R_f (Tabla 6). En todos los casos se observó una única mancha principal, lo que sugiere la presencia de un compuesto mayoritario o de una mezcla con comportamiento cromatográfico similar.

Tabla 6. Cromatografía en capa fina, R_f e interpretación de la solubilidad y movilidad del pigmento.

TLC	Fase móvil	R_f	Interpretación
1	Etanol puro	NA	La muestra se solubilizó completamente, mostrando mayor afinidad por este solvente que por la sílica.
2	Acetona:Etanol (7:3)	0.80	Buena solubilidad en este solvente polar, menor que en etanol puro.
3	Acetona	0.86	Afinidad por este solvente de polaridad media.
4	Acetato de etilo	0.96	Alta afinidad por este solvente poco polar.

La migración de la mancha varió según la fase móvil empleada: la solubilidad completa en etanol indica fuerte polaridad, mientras que su alta movilidad en solventes menos polares, indica que también tiene características apolares. Este comportamiento es compatible con una naturaleza anfipática.

Este comportamiento cromatográfico coincide con lo esperado para pigmentos del tipo azafilona, grupo de compuestos característico de especies del género *Talaromyces* y *Monascus*. Dichas moléculas presentan estructuras policíclicas con grupos oxigenados (hidroxilos, carbonilos) y cadenas laterales alifáticas o aromáticas, lo que les confiere

propiedades anfipáticas y explica su movilidad variable en fases móviles de diferente polaridad (Mapari *et al.* 2008; Dufossé *et al.* 2014; Akilandeswari & Pradeep 2016). En conjunto, los resultados de TLC respaldan la producción de un pigmento compatible con el perfil químico típico de las azafilonas, previamente descritas para *Talaromyces amestolkiae*.

7.8 Ensayos de estabilidad

En la tabla 7 se presenta una serie de pruebas de estabilidad contra diferentes factores fisicoquímicos. Los pigmentos fúngicos por lo general reportan buena estabilidad a factores como altas temperaturas y cambios en el pH. Así mismo, suelen ser más sensibles a la exposición a la luz. Esta estabilidad varía dependiendo de las propiedades intrínsecas del compuesto (Umar *et al.* 2024).

Tabla 7. Estabilidad del pigmento bajo diferentes condiciones ambientales.

Tipo de análisis	Condiciones	Estabilidad (%)
Termoestabilidad	121°C por 20 mins	94.50 ± 0.09
Estabilidad a pH	pH de 2-14 por 10 mins	> 90% (De 3-5)
Luz solar directa	2 h	99.55 ± 0.27
Luz UV	UV-A (350nm) por 12 h	88.15 ± 0.06
Presión de vapor	15 psi por 20 min	89.88 ± 0.07

Para probar su estabilidad, Bhourri y colaboradores (2020) sometieron su pigmento de *Penicillium mallochii* al calor, con temperaturas de entre los 25 y 100°C, y observaron cambios en la coloración durante el ajuste del pH de 2 a 14. Reportaron una estabilidad relativa de 94.13% y 77.26% respectivamente. De igual manera Velmugaran (2011) registró que al pigmento de *Monascus purpureus*, tuvo una estabilidad relativa de 99.0% en el rango de pH de entre 4 y 7, así como un 86.2% de estabilidad relativa a 60°C por 24 h y 95.9% a temperaturas de 121°C por 20 minutos. Estos resultados sugieren buena

estabilidad al calor y al pH en consenso. Sin embargo, se ha destacado que la fotodegradación es el factor que causa mayor pérdida en la estabilidad relativa del compuesto. Según Gong y colaboradores, la retención de más del 80% después de exposición a luz UV se considera prometedora, por lo que para este estudio se puede decir que los valores obtenidos son rescatables, e incluso superiores a los reportados para pigmentos azafilonas, carotenoides, antocianinas y flavonoides, para los cuales se presentaron con degradaciones de entre 20-50% en condiciones similares (Pandey *et al.* 2018). Los pigmentos fúngicos presentan muchas características deseables para su aplicación en diferentes industrias, como bajo impacto ambiental, viabilidad y rentabilidad. Ahora bien, si a esas características se le añade la facilidad de manejo o una extensa vida de anaquel por su estabilidad bajo diferentes factores, se incrementa su atractivo comercial, lo que podría favorecer su adopción por parte de las empresas en sustitución de los pigmentos sintéticos actualmente utilizados.

7.9 Actividad antimicrobiana

En la figura 7 se presentan los resultados del análisis de capacidad antimicrobiana por medio del método de Kirby-Bauer sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton. El extracto pigmentado con base etanólica fue utilizado en concentraciones de 2.5, 5, 10 y 20 mg/mL siguiendo la metodología de Pandey y colaboradores (2018).

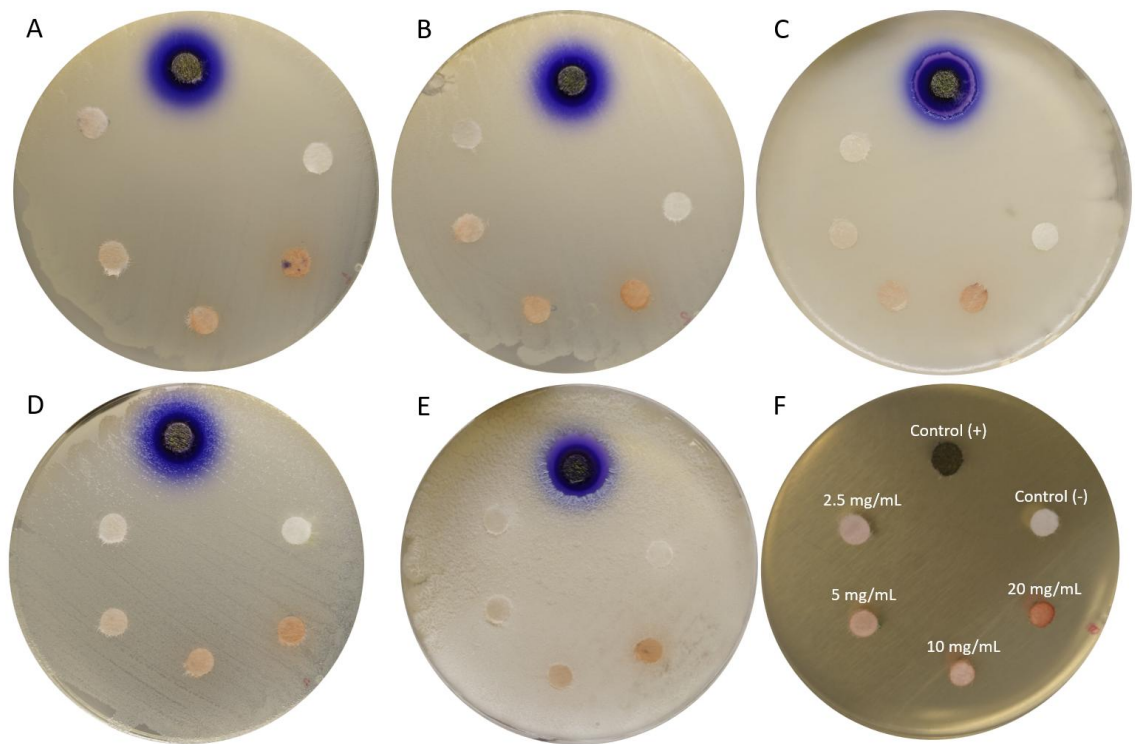


Figura 7. Análisis antimicrobiano de difusión por disco. A. *Escherichia coli*. B. *Salmonella Typhi*. C. *Listeria monocytogenes*. D. *Serratia marcescens*. E. *Bacillus subtilis*. F. Disposición de discos.

En la tabla 8 se presentan los resultados esperados para el control positivo utilizado, violeta de genciana (Al-Khikani y Ayit, 2022) que coinciden con los resultados obtenidos, descartando que la ausencia de inhibición se deba a errores metodológicos y sugieren que el extracto, bajo las concentraciones y condiciones aplicadas, no posee actividad antimicrobiana detectable frente a las cepas usadas. Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con cautela.

Tabla 8. Resultados esperados del análisis antimicrobiano para violeta de genciana.

Microorganismo	Sensibilidad	Comentario
<i>Escherichia coli</i>	Baja o moderada	Halo pequeño o nulo
<i>Salmonella Typhi</i>	Baja o moderada	Menor sensibilidad (Gram -)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sensible	Inhibición (Gram +)
<i>Serratia marcescens</i>	Moderada o baja	Menor sensibilidad (Gram -)
<i>Bacillus subtilis</i>	Sensible	Inhibición (Gram +)

El ensayo de difusión en disco (Kirby–Bauer) supone la formación de un gradiente difusivo en la fase acuosa del agar; sin embargo, el uso de un extracto etanólico introduce factores que afectan la difusión (evaporación del solvente, precipitación o migración superficial del pigmento), lo que puede producir falsos positivos y resultados visuales que no estén relacionados con la actividad antimicrobiana (Burbonja- Šonje *et al.* 2020; Afroz-Toma *et al.* 2023). Es un hecho que los pigmentos microbianos, además de ser utilizados como colorantes naturales, suelen estar acompañados de actividad biológica como anticancerígena, antioxidante y antimicrobiana, pues son producidos por el microorganismo como un mecanismo de adaptación y supervivencia a diferentes condiciones ambientales (de Menezes *et al.* 2023). Pandey y colaboradores reportaron capacidad antimicrobiana con su pigmento de *Penicillium sp.* para las bacterias Gram positivas *B. megaterium* y *B. subtilis*, así como para bacterias Gram negativas, *E. coli*, *P. putida* y *P. marginalis*. Sin embargo, utilizó diferentes solventes para su extracto, como metanol, butanol y cloroformo. Así mismo, Zhou (2023) también consiguió resultados positivos inhibitorios contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, y *Escherichia coli* utilizando metanol para extraer el pigmento de *Aspergillus ustus*. Es por esto por lo que el uso de etanol como componente principal del extracto pigmentado puede haber sido una limitante metodológica, y se propone el análisis a través de técnicas alternativas como el ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria, CMI (Yolmeh *et al.* 2016). Se advierte que las conclusiones si bien indicativas, no son concluyentes sobre el potencial antimicrobiano de este pigmento y deben reservarse hasta la obtención de evidencia cuantitativa adicional.

7.10 Prueba de toxicidad

El uso de *Artemia salina* en ensayos de toxicidad aguda sigue extendiéndose en estudios actuales debido a su simplicidad, bajo costo y reproducibilidad, en especial para corroborar la predicción del potencial tóxico de diversos compuestos (Salay *et al.* 2024). La figura 8 muestra la disposición utilizada para el presente ensayo, realizado en dos microplacas de 12 pocillos, en las cuales se agregaron los nauplios de *Artemia salina* para probar las diferentes concentraciones del extracto (Figura 8).



Figura 8. Análisis de toxicidad con *Artemia salina*. Columnas de izquierda a derecha: agua destilada (control negativo), violeta de genciana (control positivo), extracto de pigmento a concentración de 10, 100, 1000 y 10000 mg/L. Todas las soluciones fueron ajustadas a una salinidad de 3.5% y pH 8.

En la tabla 9 se muestran los resultados del modelo estadístico PROBIT realizado en SPSS que arrojaron una chi-cuadrada de $\chi^2 = 0.401$ que refleja un buen ajuste del modelo (Sig. > 0.050). Como pauta general, tomando en cuenta el criterio requerido para los ensayos de toxicidad con *Artemia salina* en alimentos, un valor de $LC_{50} > 1000$ mg/L se

considera como no tóxico (Meyer *et al.* 1982). En este caso, el LC₅₀ del extracto de pigmento fue de 2000.29 mg/L, con un límite de confianza de 95% de entre 1307.93 – 3156.45 mg/L. Este rango es amplio, sin embargo, está fuera del límite de toxicidad establecido por Meyer, por lo que se espera que en sus aplicaciones el pigmento presente una muy baja o nula toxicidad.

Tabla 9. Análisis de toxicidad del extracto pigmentado de *Talaromyces amestolkiae* con *Artemia salina*.

PROBIT	Log(dosis)	n	Respuesta observada	Límite de confianza del 95% por Log(dosis)			
				LC ₅₀ (mg/L)	Límite inferior	Límite superior	Sig.
1	1.000	10	0	2000.29	1307.93	3156.45	0.401(a)
2	1.000	10	0				
3	1.000	10	0				
4	1.000	10	0				
5	2.000	10	1				
6	2.000	10	0				
7	2.000	10	1				
8	2.000	10	0				
9	3.000	10	1				
10	3.000	10	2				
11	3.000	10	3				
12	3.000	10	2				
13	4.000	10	9				
14	4.000	10	9				
15	4.000	10	10				
16	4.000	10	9				

a. Como el ajuste del modelo fue adecuado ($p > 0.05$), no fue necesario aplicar un factor de corrección por heterogeneidad para estimar los intervalos de confianza del LC₅₀.

En un estudio similar, Zhou y colaboradores (2023) probaron la toxicidad de un pigmento de *Aspergillus ustus* para su implementación en el área de alimentos, obteniendo LC₅₀ de 842 mg/L, y un límite de confianza de 95% de 1338 – 2259 mg/L, por lo que obtuvieron una toxicidad baja. En cuanto a hongos del mismo género, Chadni y colaboradores (2017) obtuvieron un LC₅₀ de 56.69 mg/L en *Artemia* con su extracto de pigmento rojo obtenido de *Talaromyces verruculosus*. Sin embargo, el uso destinado de este pigmento era para el área textil, por lo que se llegó a la conclusión que de la toxicidad presente en este pigmento era despreciable y el colorante seguro para su empleo.

Diversos pigmentos fúngicos han sido considerados en los últimos años por ser amigables con el medio ambiente y más rápidamente biodegradables que sus contrapartes sintéticas. Estos se encuentran siendo proyectados para su uso en textiles, colorantes alimenticios y aplicaciones antimicrobianas y anticancerígenas (Poorniammal *et al.* 2021). Sin embargo, la mayoría de los hongos producen micotoxinas a la par de los pigmentos, como es el caso de los hongos de género *Monascus*, por lo que han sido prohibidos en los Estados Unidos y la Unión Europea por la presencia de toxinas como la citrinina. Compuestos tipo *Monascus* han sido encontrados en hongos de géneros *Penicillium* y *Talaromyces* (antes clasificados *Penicillium*) y han sido considerados alternativas con potencial industrial deseable porque, a diferencia del género original, la síntesis de estos compuestos la llevan a cabo en ausencia de toxinas (Dufossé *et al.* 2014; Afroz-Toma *et al.* 2023). Tal es el caso del hongo *Talaromyces purpurogenus* (antes *Penicillium purpurogenum*) que produce enzimas y pigmentos de interés biotecnológico (Caro *et al.* 2017). El aprovechamiento de los pigmentos fúngicos dependerá de la cepa a utilizar, de su capacidad de sintetizar pigmentos en ausencia de micotoxinas, pero también a la finalidad específica que se otorgue a estos para su aprovechamiento biotecnológico a nivel industrial.

VIII. CONCLUSIONES

El microorganismo utilizado en este estudio corresponde a una cepa de *Talaromyces amestolkiae* metalotolerante, identidad confirmada por caracterización morfológica y molecular. Conocer la identidad de este hongo permitió asociar la producción de pigmento rojo a metabolitos del tipo azafilona, característicos de esta especie. La fase estacionaria se alcanzó al día 7, lo que coincide con el inicio de la producción de metabolitos secundarios, y la producción óptima de pigmento se obtuvo en condiciones de medio PDB, pH 5 y agitación de 150 rpm. El rendimiento de 6.84 g/L indica que la producción de pigmento podría ser escalable.

Los ensayos exploratorios por TLC mostraron una única mancha principal con comportamiento consistente con la polaridad y naturaleza anfipática típica de las azafilonas. Esto respalda la identidad química sugerida por la identificación molecular y confirma que el extracto contiene un compuesto mayoritario o una mezcla con comportamiento cromatográfico similar.

El extracto pigmentado demostró una alta estabilidad frente a temperatura, pH, luz solar y presión de vapor, con retención relativa al 90%. La fotodegradación por exposición a luz UV, siendo el factor más crítico, provocó una reducción leve (88%), aunque leve en comparación con lo reportado para pigmentos similares. La prueba de toxicidad con *Artemia salina* indicó un LC_{50} de 2000.29 mg/L, clasificando al extracto como no tóxico y respaldando su seguridad para aplicaciones biotecnológicas.

IX. PERSPECTIVAS

Los resultados presentados en este estudio representan un primer acercamiento para evaluar el potencial biotecnológico del organismo. Con la finalidad de continuar con esta prospección inicial, se propone el uso de técnicas más avanzadas de purificación y caracterización del pigmento, tales como Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) y espectrometría de masas (MS), con el objetivo de confirmar la estructura molecular exacta.

Sería conveniente ampliar los estudios de toxicidad, incorporando modelos celulares y análisis de metales pesados por espectrometría de absorción atómica, para garantizar que el extracto no presente riesgo de bioacumulación debido al origen del aislado.

El pigmento podría explorarse como colorante natural en industrias alimentaria, farmacéutica o textil, siempre y cuando se confirme su inocuidad y estabilidad. También resulta pertinente evaluar alternativas de producción a base de sustratos como subproductos o residuos agroindustriales.

Estudios comparativos de expresión con otras cepas de *Talaromyces amestolkie* permitirían identificar genes involucrados en la síntesis del pigmento y definir estrategias más eficientes para su explotación. Así mismo, podría considerarse la manipulación de la base genética involucrada en la producción del pigmento, ya sea para inducir su expresión o transferirla a otros microorganismos mediante ingeniería genética.

Finalmente, se sugiere explorar el potencial de la cepa para la producción de otros compuestos bioactivos, con posibles propiedades antioxidantes, anticancerígenas u otras bioactividades de interés.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Afroz-Toma M, Rahman H, Rahman S, Arif M, Nazir NH, Dufossé L (2023). Fungal pigmentos: carotenoids, riboflavin, and polyketides with diverse applications. *J Fungi* 9, 454.
2. Anugraha AC, Thomas T. 2021. A review on pigment producing soil fungi and its applications. *AJOM* 4(1):89-112.
3. Akilandeswari P, Pradeep BV. 2016. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(4): 1631-1643.
4. Babitha S, Soccol CR, Pandey A. 2007. Effect of stress on growth, pigment production and morphology of *Monascus* sp. In solid cultures. *J Basic Microbiol* 47:118-126.
5. Bagy MMK, Nafady NA, Hassan EA, Reyad MS. 2023. Isolation and characterization of pigment producing fungi. *AUNJMSR* 52(1): 152-176.
6. Barnett HL, Hunter BB. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi (4th ed). *Burgess publishing company*: USA.
7. Bubonja-Šonje M, Knežević S, Abram M. 2020. Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. *Arh Hig Rada Toksikol* 71(4):300-311.
8. Caro Y, Ventatachalam M, Lebeau J, Fouillaud M, Dufossé L. 2017. Pigments and colorants from filamentous fungi. In *Fungal Metabolites*. Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 499-568.
9. Chadni Z, Rahaman H, Jerin I, Hoque KMF, Reza A. 2017. Extraction and optimisation of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries. *Mycol* 17:40.
10. Chintapenta LK, Rath CC, Maringinti B, Ozbay G. 2014. Pigment production from a mangrove *Penicillium*. *AJB*. 13(26):2668-2674.
11. de Menezes GCA, Madureira de Medeiros TD, de Oliveira Lima IG, da Silva MB, Cavalcanti de Queiroz A, Fernandes Duarte AW, de Oliveira VM, Rosa LH, Lemos Bicas J. 2023. Chapter 10 - Pigments from extremophiles. En: Chhikara N, Pahghal A, Chaudhary G. 2023. *Microbes in the food industry*. Scrivener Pub, 393-440 pp.

12. Dikshit R, Tallapragada P. 2014. Collective effects of stress on optimization of pigment production by *Monascus purpureus*. *Chiang Mai J* 41(3): 524-530.
13. Dufossé L, Fouillaud M, Caro Y, Mapari SAS, Sutthiwong N. 2014. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Curr Opin Biotechnol*, 26: 56-61.
14. Dufossé L. 2018. Red colourants from filamentous fungi: Are they ready for the food industry? *J Food Compost Anal* 69:156-161.
15. Elattaapy AM, Selim MA. 2020. Factors affecting red pigment production by local fungal isolate of *Penicillium sp.* *J Agr Chem Biotechnol* 11(9): 255-261.
16. Gao JM, Yang SX, Qin JC. 2013. Azaphilones: chemistry and biology. *Chem Rev* 113: 4755-4811.
17. Gong X, Luo H, Wu X, Liu H, Sun C, Chen S. 2023. Production of red pigments by a newly isolated *Talaromyces aurantiacus* strain with LED stimulation for screen printing. *Indian J Microbiol* 62(2): 280-292.
18. Gunasekaran S, Poorniammal R. 2008. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium sp.* Under submerged cultivation. *AJB* 7(12):1894-1898.
19. Gupta C, Sharma D, Aggarwal S, Nagpal N. 2013. Pigment production from *Trichoderma spp.* For dyeing of silk and wool. *IJSN* 4(2):351-355.
20. Himri I, Guaadaoui A, Souna F, Bouakka M, Melhaoui A, Hakkou A, Saalaoui. 2013. Toxicity testing of tartrazine using the nematode *Caenorhabditis elegans*, brine shrimp larvae (*Artemia salina*) and KGN granulosa cell line. *J Appl Pharm Sci* 3(11): 051-058.
21. Jancic S, Frisvad JC, Kocev D, Gostincar C, Dzeroski S, Gunde-Cimerman N. 2016. Production of secondary metabolites in extreme environments: Food- and airborne *Wallemia spp.* produce toxic metabolites at hypersaline conditions. *PLoS One* 11(12):e0169116.
22. Kalra R, Conlan XA, Goel M. 2020. Fungi as a potential source of pigments: Harnessing Filamentous. *Fungi Font Chem* 8:369.
23. Kaur P, Ghoshal G, Jain A. 2019. Bio-utilization of fruits and vegetables waste to produce B-carotene in solid-state fermentation: Characterization and antioxidant

- activity. *Process Biochem* 76:155-164.
24. Khan AA, Alshabi AM, Alqahtani YS, Alqahtani AM, Bennur RS, Shaikh IA, Muddapur UM, Iqbal SMS, Mohammed T, Dawoud A, More SS, Maqbul MS. 2021. Extraction and identification of fungal pigment from *Penicillium europium* using different spectral studies. *J King Saud Univ Sci* 33:101437.
 25. Kogej T, Wheeler MG, Lanisnik Rizner T, Gunde-Cimerman N. 2004. Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. *FEMS Microbiol Lett* 232:203-209.
 26. Lebeau J, Venkatachalam M, Fouillaud M, Petit T, Vinale F, Dufossé L, Caro Y. 2017. Production and new extraction method of polyketide red pigments produced by *Ascomycetus* fungi from terrestrial and marine habitats. *J Fungi* 3:34.
 27. Lin L, Xu JX. 2023. Production of fungal pigments: Molecular processes and their applications. *J Fungi* 9, 44.
 28. Lourenço-Lopes C, Carreira-Casais A, Fraga-Corral M, Garcia-Oliveira P, Soria A, Jarboui A, Barral M, Otero P, Simal-Gandara J, Prieto MA. 2021. Carotenoids as natural colorful additives for the food industry. In: Natural Food Additives, Prieto M and Otero P. *IntechOpen*, 101208.
 29. Manon-Mani V, Shanmuga-Priya M, Dhaylini S, Preethi K. 2015. Antioxidant and antimicrobial evaluation of bioactive pigment from *Fusarium sp* isolated from stressed environment. *IJCMAS* 4(6):1147-1158.
 30. Mapari SAS, Meyer AS, Thrane U. 2006. Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. *J Agric Food Chem* 54(19): 7027-35.
 31. Morales-Oyervides L, Oliveira JC, Sosa-Gallagher MJ, Méndez-Zavala A, Montañez JC. 2017. Selection of best conditions of inoculum preparation for optimum performance of the pigment production process by *Talaromyces* spp. Using the Taguchi method. *Biotechnol prog*, 33(3): 621-632.
 32. Narendrababu S, Shishupala S. 2017. Spectrophotometric detection of pigments from *Aspergillus* and *Penicillium* isolates. *J Appl Biol* 5(01):053-058.
 33. Nematollahi A, Aminimoghadamfarouj N, Wiart C. 2012. Reviews on 1,4-naphthoquinones from *Diospyros* L. *J Asian Nat Prod Res* 14:80-88.

34. Oh JJ, Kim JY, Kim YJ, Kim S, Kim GH. 2021. *Chemosphere* 272:129884.
35. Oliveira C, Costa J, Vendruscolo F. 2019. Maltose syrup residue as the substrate for *Monascus* pigment production. *Biocatal Agric Biotechnol* 18:101101.
36. Oliveira F, Hirai PR, Teixeira MFS, Pereira JFB, Santos-Ebinuma VC. 2020. *Talaromyces amestolkiae* cell disruption and colorant extraction using imidazolium-based ionic liquids. *Sep Purif Technol*, 257: 117759.
37. Padhi S, Masi M, Cimmino A, Tuzy A, Jena S, Tayung K, Evidente A. 2019. Funiculosone, a substituted dihydroxanthene-1,9-dione with two of its analogues produced by endolichenic fungus *Talaromyces funiculosus* and their antimicrobial activity. *Phytochem* 157, 175-183.
38. Palacio-Barrera AM, Areiza D, Zapata P, Atehortúa L, Correa C, Peñuela-Vásquez M. 2018. Induction of pigment production through media composition, abiotic and biotic factors in two filamentous fungi. *Biotechnol Rep* 20:e00308.
39. Pandey N, Jain R, Pandey A, Tamta S. 2018. Optimisation and characterization of the orange pigment produced by a cold adapted strain of *Penicillium sp.* (GBPI_P155) isolated from mountain ecosystem. *Mycology* 9(2):81-92.
40. Poorniammal R, Prabhu S, Dufossé L, Kannan J. 2021. Safety evaluation of fungal pigments for food applications. *J Fungi (Basel)* 7(9):692.
41. Pradeep FS, Begam MS, Palaniswamy M, Pradeep BV. 2013. Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. *World Appl Sci J* 22 (1): 70-77.
42. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. 2017. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J Nat Prod* 80(3).
43. Raper B, Kenneth B, Thom C. 1949. A manual of the *Penicillia*. *Williams & Wilkins Company*: Baltimore.
44. Rengifo LR, Rosas P, Méndez N, Ludeña Y, Sirvas S, Samolski I, Villena GK. 2023. Comparison of pigment production by filamentous fungal strains under submerged (SmF) and surface adhesion fermentation (SAF). *J Fungi* 9:48.
45. Ryu MR, Yoo IY, Song DJ, Huh HJ, Ki CS, Lee NY. 2017. *Penicillium* species other than *Talaromyces marneffei* producing red pigment from clinical specimens:

- Isolation of *Talaromyces albobiverticillius*. *LMO* 7(4):211-214.
46. Salay G, Lucarelli N, Gascón TM, Sanches de Carvalho S, Luciano da Veiga GR, Aguiar Alves Reis BC, Affonso Fonseca FL. 2024. Acute Toxicity Assays with the *Artemia salina* Model: Assessment of Variables. *Altern Lab Anim*, 52(3): 142-148.
 47. Umar A, Darwish DBE, Alenezi MA. 2024. Chapter 9 – Fungal pigments: secondary metabolites and their application. En: Abd-elsalam KA y Mohamed HI. Fungal Secondary Metabolites. Synthesis and Applications in Agroecosystem. Nanobiotechnology for Plant Protection, 173-195 pp.
 48. Valenzuela-Gloria MS, Balagurusamy N, Chávez-González ML, Aguilar O, Hernández-Almanza A, Aguilar CN (2021). Molecular characterization of fungal pigments. *J Fungi* 7, 326.
 49. Velmurugan P, Hur H, Balachandar V, Kamala-Kannan S, Lee KJ, Lee SM, Chae JC, Shea PJ, Oh BT. 2011. *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *JBB* 112(6):590-594.
 50. Venil CK, Velmurugan P, Dufossé L, Devi PR, Ravi AV. 2020. Fungal pigments: potential coloring compounds for wide ranging applications in textile dyeing. *J Fungi* 6(2), 68.
 51. Villanueva-Lozano H, Treviño-Rangel RJ, Renpenning-Carrasco EW, González GM. 2017. Successful treatment of *Talaromyces amestolkiae* pulmonary infection with voriconazole in an acute lymphoblastic leukemia patient. *J Infect Chemother* 23: 400-402.
 52. Yilmaz N, Houbraken J, Hoekstra ES, Frisvad JC, Visagie CM, Samson RA. 2012. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. *Pers: Mol Phylogeny Evol Fungi* 29: 39-54.
 53. Yilmaz N, Visage CM, Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA. 2014. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Stud Mycol* 78: 175-341.
 54. Yolmeh M, Hamed H, Khomeiri M. 2016. Antimicrobial activity of pigments extracted from *Rhodotorula glutinis* against some bacteria and fungi. *Zahedan J Red Med Sci*, 18(12): e4954.
 55. Zaccarim BR, de-Oliveira F, Passarini MRZ, Duarte AWF, Sette LD, Jozala AF, Teixeira MFS, Santos-Ebinuma VC. 2019. Sequencing and phylogenetic analyses

of *Talaromyces amestolkiae* from amazon: a producer of natural colorants. *Biotechnol Prog* 35(1).

56. Zheng L, Cai Y, Zhou L, Huang P, Ren X, Zuo A, Meng X, Xu M, Liao X. 2017. Benzoquinone from *Fusarium* pigment inhibits the proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 cells through the NF-kB pathway via estrogen receptor signaling. *Int J Mol Med* 39:39-46.
57. Zhou M, Chen Y, Fang X, Wu L, Zhang Y. 2023. Isolation and identification of pigment-producing filamentous fungus DBFL05 and its pigment characteristics and chemical structure. *CYTA – Journal of food* 21(1):374-385.