

Obtención de un biofármaco mediante la fermentación de microorganismos patógenos y comprobar su efectividad en cada uno.

Autor: Moyano Gaibor, José Andres

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Trabajo de Integración Curricular previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Tutora: BqF. Anabell Del Rocío Urbina Salazar Ph.D

**Santo Domingo, Ecuador
2023**



Introducción

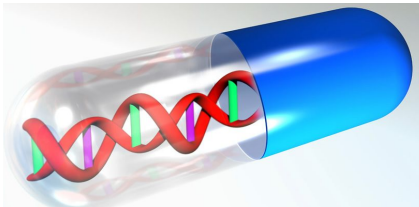
Biofarmacéuticos



El término fue acuñado en la década de 1980, son los productos farmacéuticos producidos en procesos biotecnológicos utilizando métodos de biología molecular.

Se diferencian de las drogas sintéticas por:

- Naturaleza del producto
- Fuente del principio activo
- Bioequivalencia
- Estructura
- Métodos de fabricación



Los productos biofarmacéuticos pueden ser metabolitos intracelulares o extracelulares que tienen un efecto farmacológico.

Sistemas de producción de biofarmacéuticos

- Sistema de expresión de mamíferos.
- Sistema de expresión bacteriano
- Sistema de expresión de levadura
- Sistema de expresión de insectos
- Sistema de expresión de líneas celulares de insectos
- Sistema de expresión vegetal

Objetivos

Objetivo General

Obtener un biofármaco mediante la fermentación de microorganismos patógenos y comprobar su efectividad en cada uno.

Objetivos Específicos

- Purificar un microorganismo patógeno productor de un fitofármaco.
- Obtener un biofármaco mediante la fermentación de microorganismos.
- Purificar el biofármaco mediante precipitación y filtración.
- Encapsular el biofármaco mediante emulsión iónica.

Hipótesis.

Factor A

- **Ho:** El tipo de medio de cultivo no influye en la obtención del biofármaco.
- **Ha:** El tipo de medio de cultivo influye en la obtención del biofármaco.

Factor B

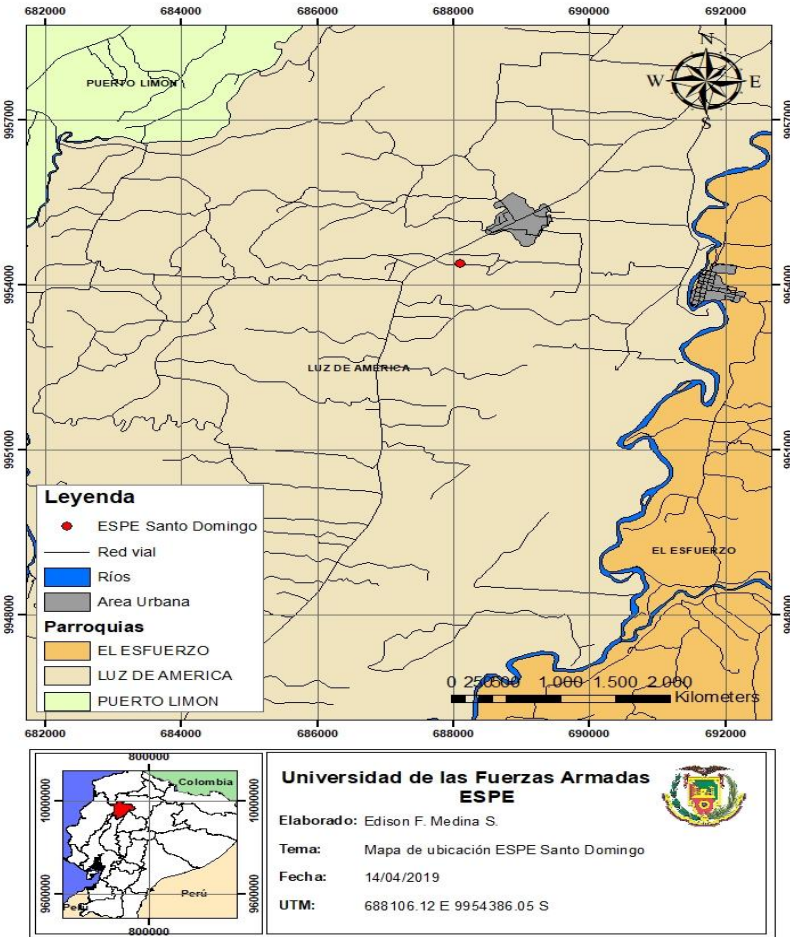
- **Ho:** El tipo de oxigenación no influye en la obtención del biofármaco.
- **Ha:** El tipo de oxigenación influye en la obtención del biofármaco.

Factor C

- **Ho:** El tiempo de toma de datos no influye en la obtención del biofármaco.
- **Ha:** El tiempo de toma de datos influye en la obtención del biofármaco.

Materiales y métodos

Mapa de ubicación geográfica del área de investigación



Ubicación política

- **País:** Ecuador
- **Provincia:** Santo Domingo de los Tsáchilas
- **Cantón:** Santo Domingo
- **Parroquia:** Luz de América
- **Sector:** Vía Quevedo Km 24

Ubicación ecológica

- **Zona de vida:** Bosque húmedo tropical
- **Altitud:** 224 msnm
- **Temperatura media:** 24.6 °C
- **Precipitación:** 2860 mn/año
- **Humedad relativa:** 85%
- **Heliofanía:** 680 horas luz/año
- **Suelos:** Franco Arenoso
- **Fuente:** Estación Agro Meteorológica “Puerto Ila” Vía Quevedo Km 34



Materiales y métodos

Obtención del microorganismo.



1

Obtención de la cepa



2

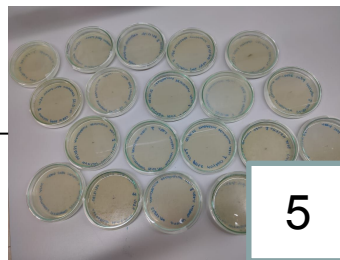
Preparación del medio PDA



Dispensación del medio PDA



Incubación



5

Sellado de las cajas



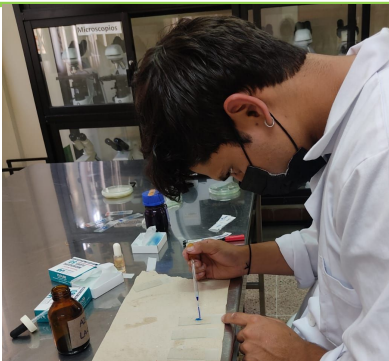
4

Siembra del microorganismo



Materiales y métodos

Identificación del microorganismo



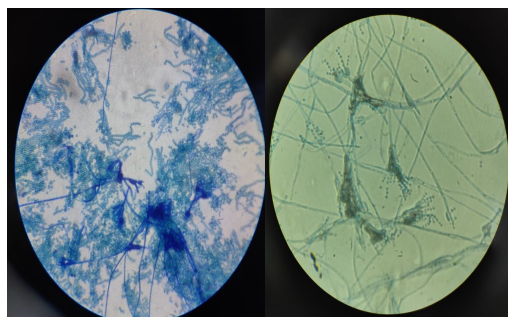
Gota de azul de metileno o lactofenol.



Toma de muestra



Colación de la cinta en el portaobjeto



Observación de estructuras

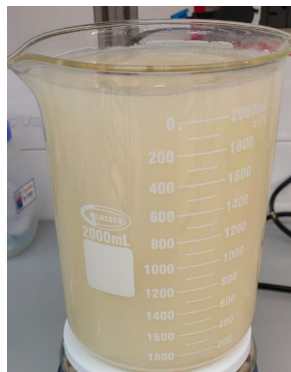


Observación microscópica
40x y 100X



Material es y métodos

Fermentación.



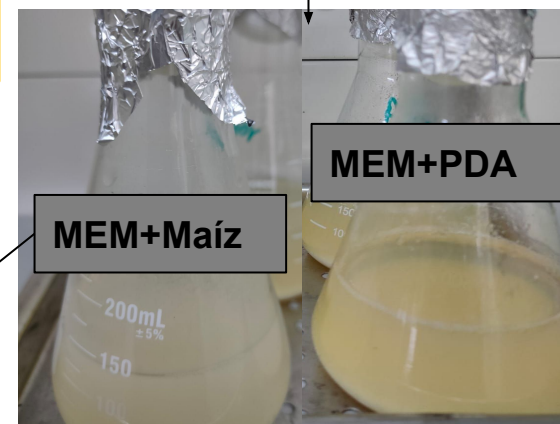
Reactivos

(Na ₂ HPO ₄)	(MnCl ₂ *4H ₂ O)
((NaNO ₂)	(ZnCl ₂)
(NaSO ₄)	(CaCl ₂ *2H ₂ O)
(KH ₂ PO ₄)	(FeCl ₃ *6H ₂ O)
(MgSO ₄ *7H ₂ O)	(CoCl ₂ *2H ₂ O)

Preparación del medio mínimo enriquecido



Agar y Maíz



Preparación de medios.



Esterilización.



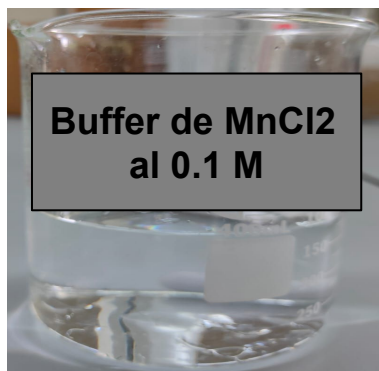
Ajuste de pH



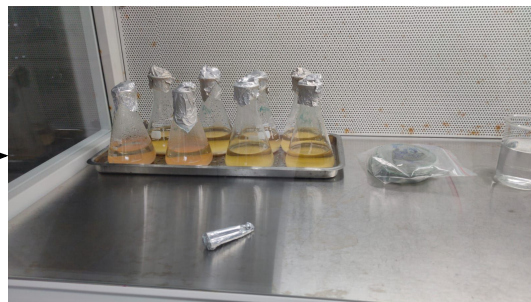
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Material es y métodos

Siembra del microorganismo.



Buffer de MnCl₂ 0.1M



Medios/ Materiales/ Muestra
en cámara de flujo laminar



Microorganismo +
Buffer.



Sellado de los medios
de fermentación.

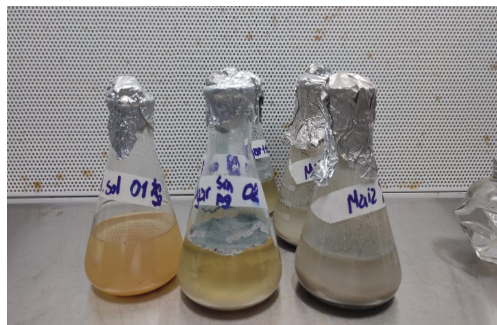


Siembra



Materiales y métodos

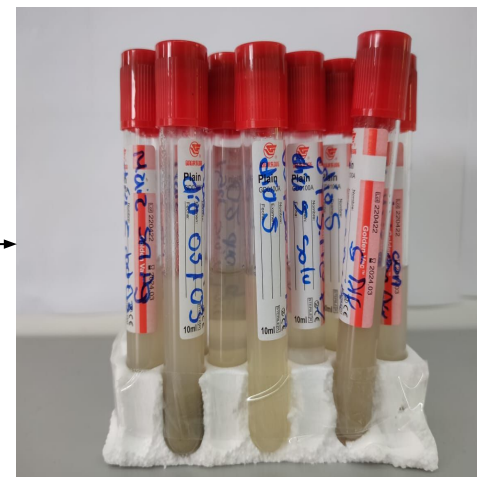
Toma de muestras de los medios de cultivos fermentados.



Medios de cultivo fermentados



Tomar 5 ml de cada medio.



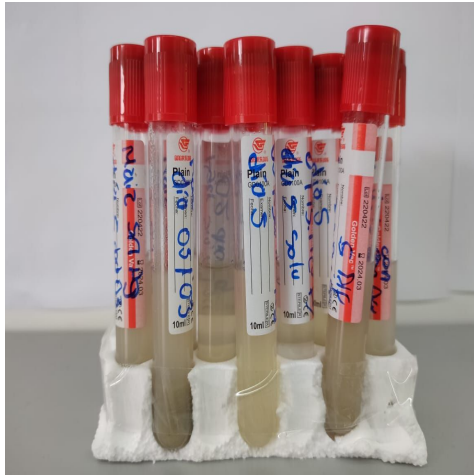
Conservar en tubos hermeticamente sellados.

Se realizó en los diferentes días de las tomas de muestra (Día: 0, 5, 7, 11, y 14)



Materiales y métodos

Determinación de biomasa



Muestras de los diferentes días



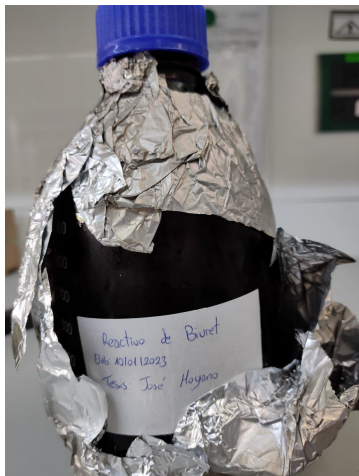
Centrifugación de las muestras



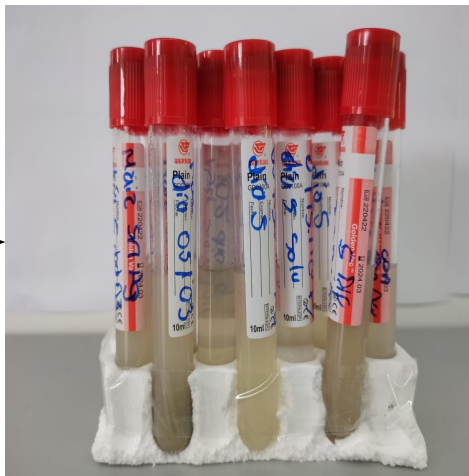
Medición por espectrofotometría a 540nm del sobrenadante.

Materiales y métodos

Determinación de la cuantificación de proteínas



Preparación del reactivo de Biuret.



Muestras de los diferentes días



Centrifugación de las muestras



Medición por espectrofotometría a 540nm



Incubación de las muestras

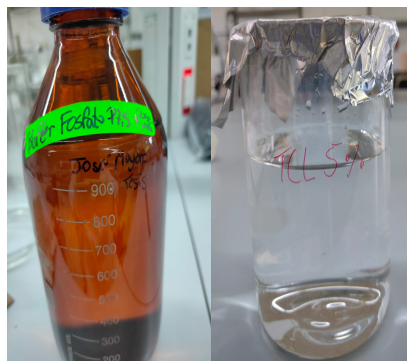


Sobrenadante + Reactivo de Biuret

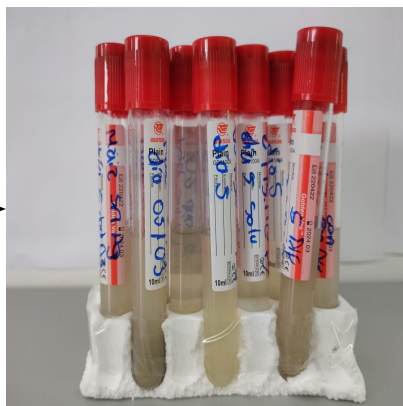


Materiales y métodos

Determinación de la actividad Proteolítica



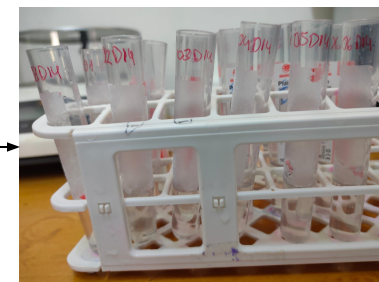
Preparación del buffer fosfato de caseína al 1% y del TCL 5%



Muestras de los diferentes días



Centrifugación de las muestras



Sobrenadante + buffer fosfato



Medición por espectrofotometría a 540nm



Centrifugación



Sobrenadante + buffer fosfato + TCL

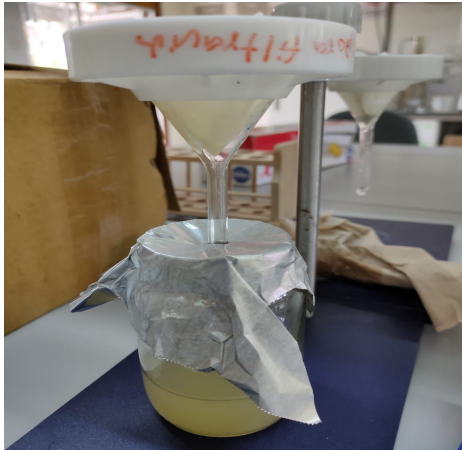


Incubación de las muestras



Material es y métodos

Purificación



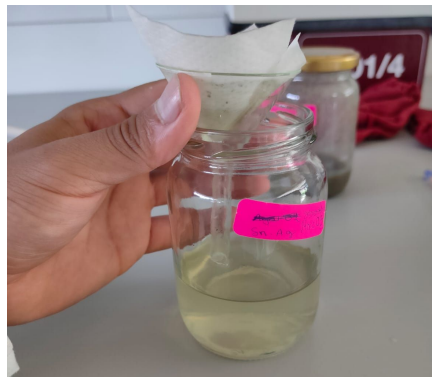
Filtración



Centrifugación



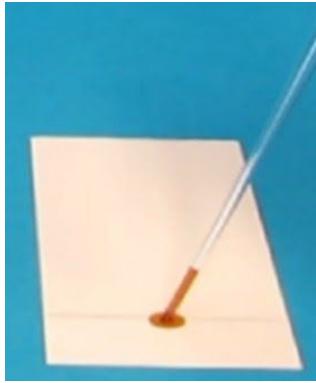
Medio + Sulfato de amonio



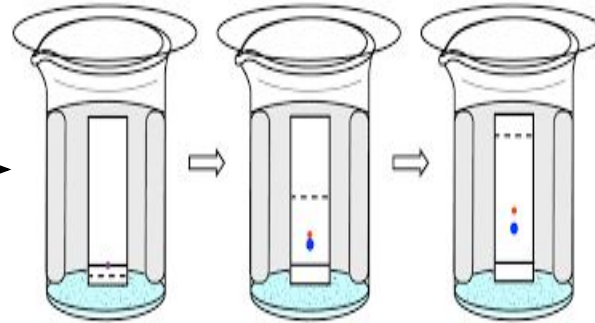
Filtración y almacenamiento.

Materiales y métodos

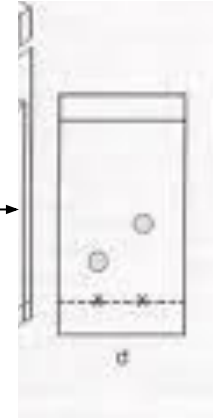
Cromatografía de capa fina (CCF)



Cargar las muestras



Colocar en la cámara con la solución móvil.

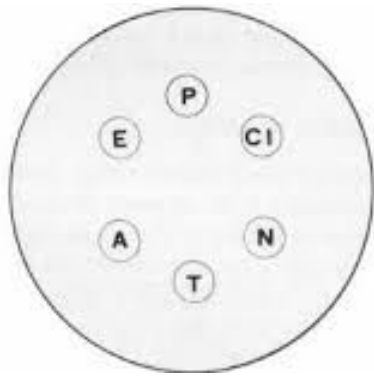


Revelación con vapor de yodo metálico.



Materiales y métodos

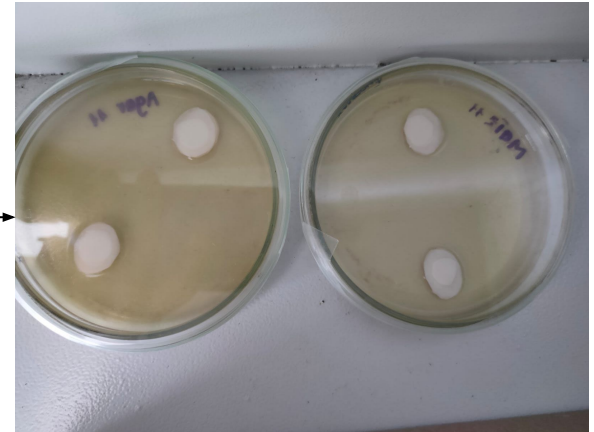
Antibiograma.



Muestras cargadas en papel filtro.



Siembra del microorganismo.



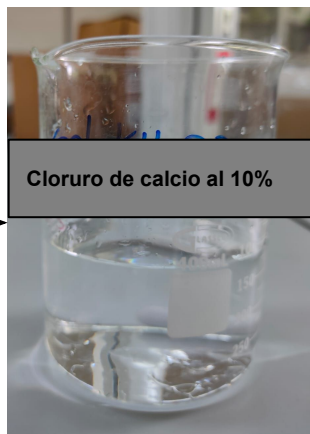
Discos cargados con el antibiótico.

Material es y métodos

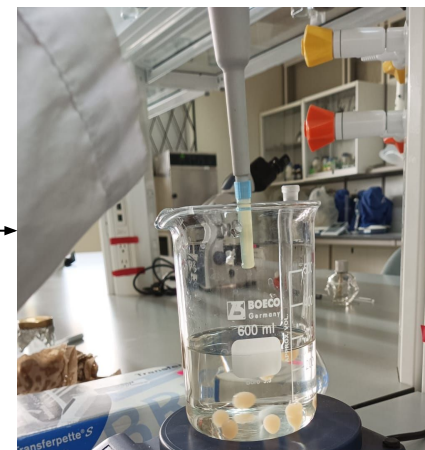
Microenpsulación con alginato



Muestras purificadas + alginato.



Solución de cloruro de calcio



Encapsulación de la muestra en el cloruro de calcio.



Microencapsulación



Materiales y métodos

Diseño experimental

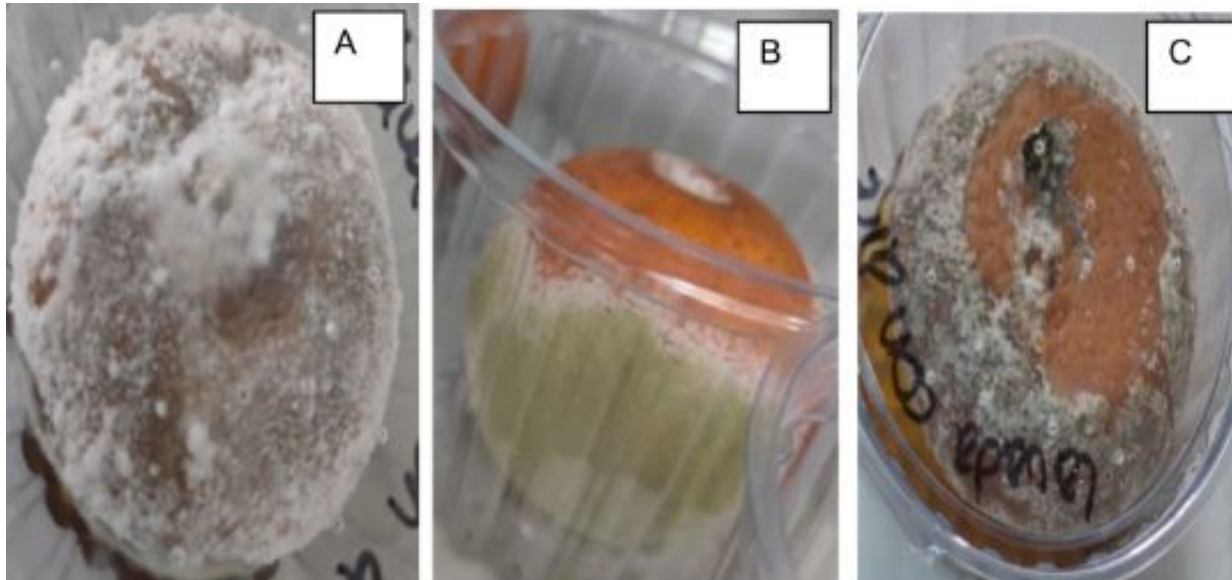
Factores de estudio que actúan en el proceso de obtención del biofármaco.

Factores	Simbología	Niveles
Medios de cultivo (A)	a0	MEM
	a1	MEM + Agar
	a2	MEM + Maíz
Tipo de oxigenación (B)	b0	Sin agitación
	b1	Con agitación
Días de medición (C)	c0	0
	c1	5
	c2	7
	c3	11
	c4	14



Resultados y Discusión

Desarrollo macroscópico de las colonias del hongo *Penicillium*



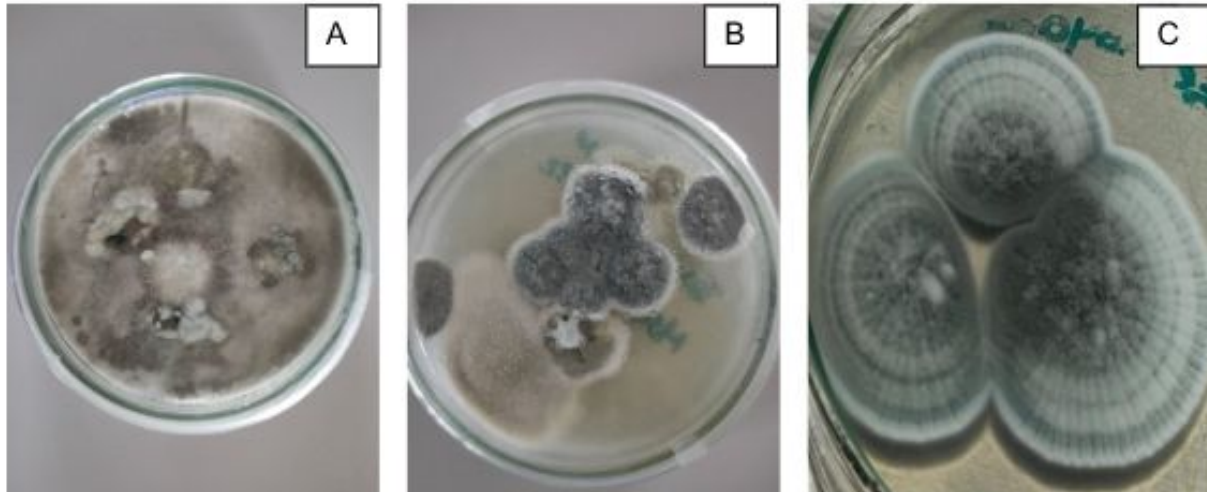
(Fernández-Andrade et al., 2019) menciona que el género *Penicillium* es un hongo filamentosos capaz de desarrollarse en diferentes ambientes de la naturaleza.

(Soliz Santander et al., 2020) señala que ataca a cítricos y es considerado como la podredumbre verde o azul.



Resultados y Discusión

Desarrollo de la obtención de la cepa pura del hongo *Penicillium*

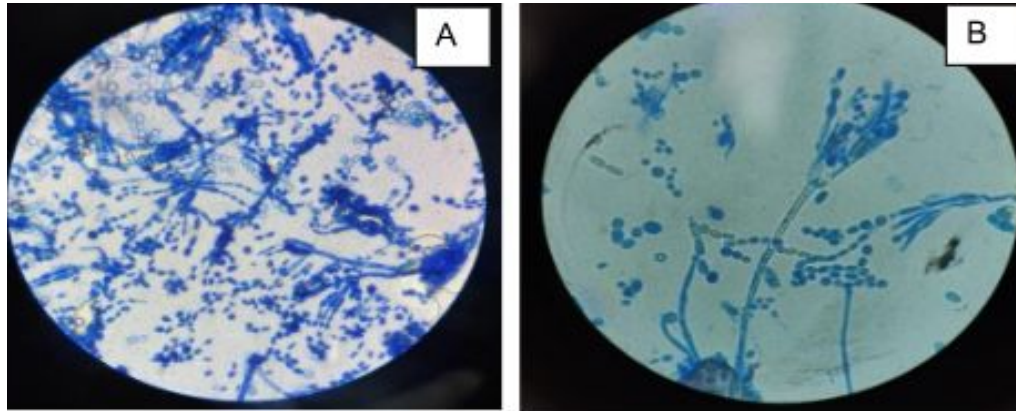


(Parra y otros, 2018) establece en su investigación que el hongo se desarrolla al quinceavo día e influyen condiciones de temperatura y condiciones ambientales.

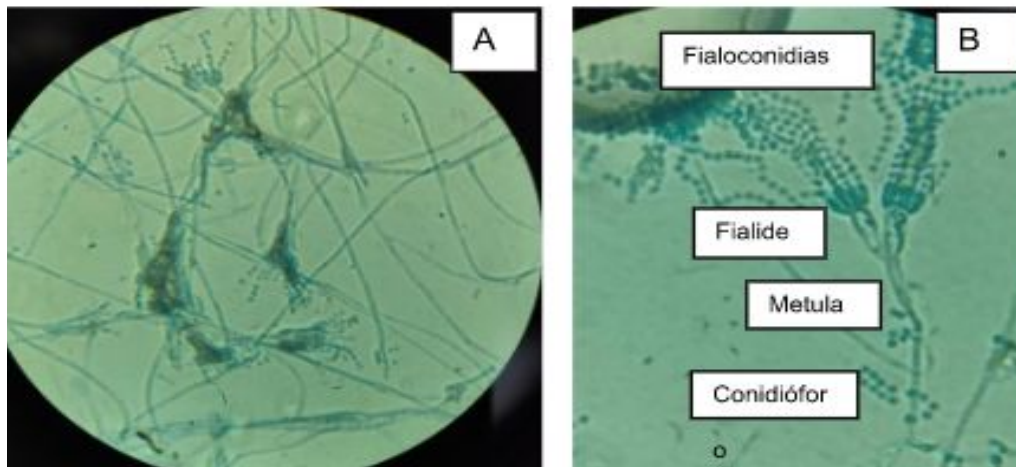


Resultados y Discusión

Identificación microscópica del hongo *Penicillium* por azul de metileno

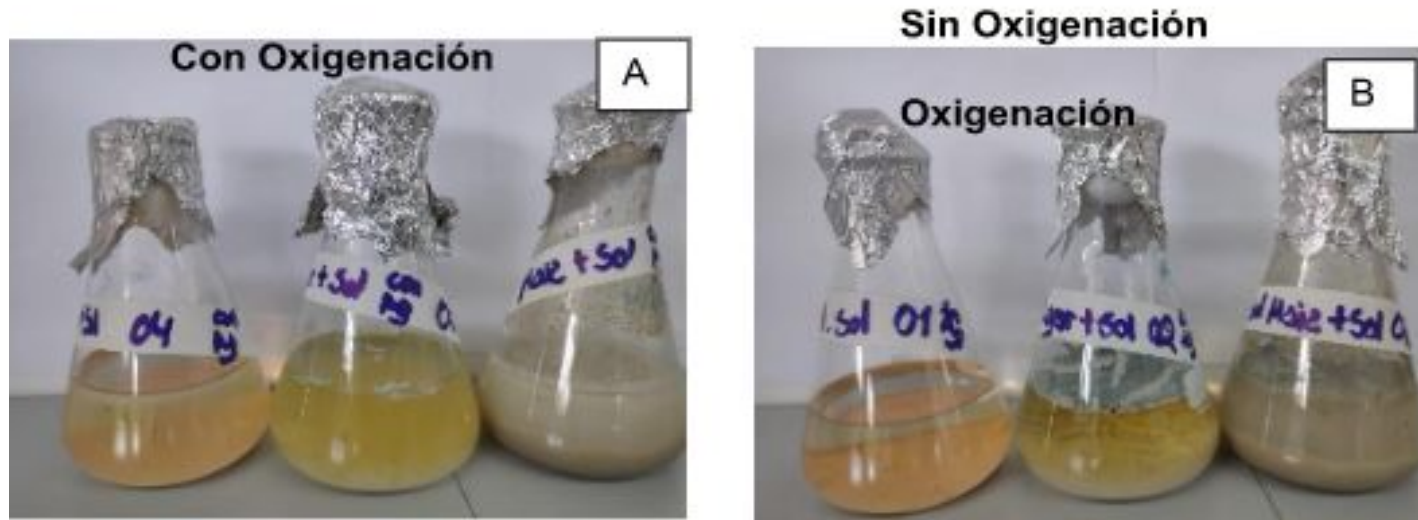


Identificación microscópica del hongo *Penicillium* por lactofenol



Resultados y Discusión

Crecimiento del hongo del género *Penicillium* en los diferentes medios de cultivo y condiciones

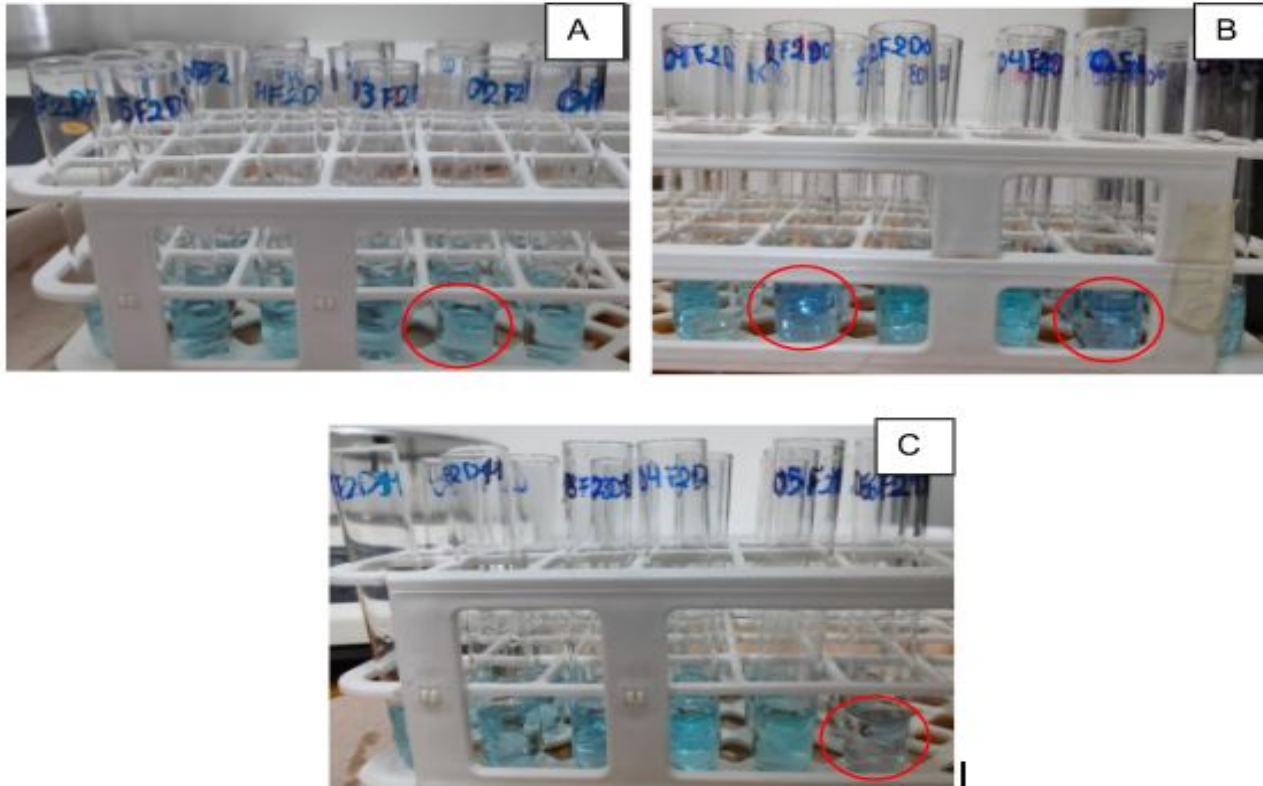


Según (León León, 2008) un medio de cultivo enriquecido debe contener fuentes de compuestos inorgánicos, se ha señalado el uso del maíz como fuente de carbohidratos y azúcares.



Resultados y Discusión

Toma de datos mediante el método de Biuret para proteínas totales

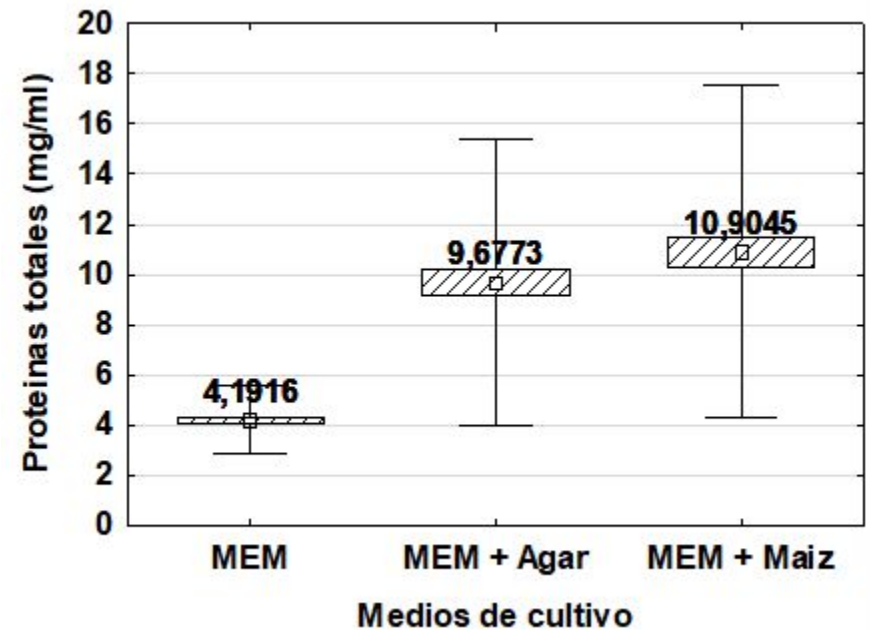
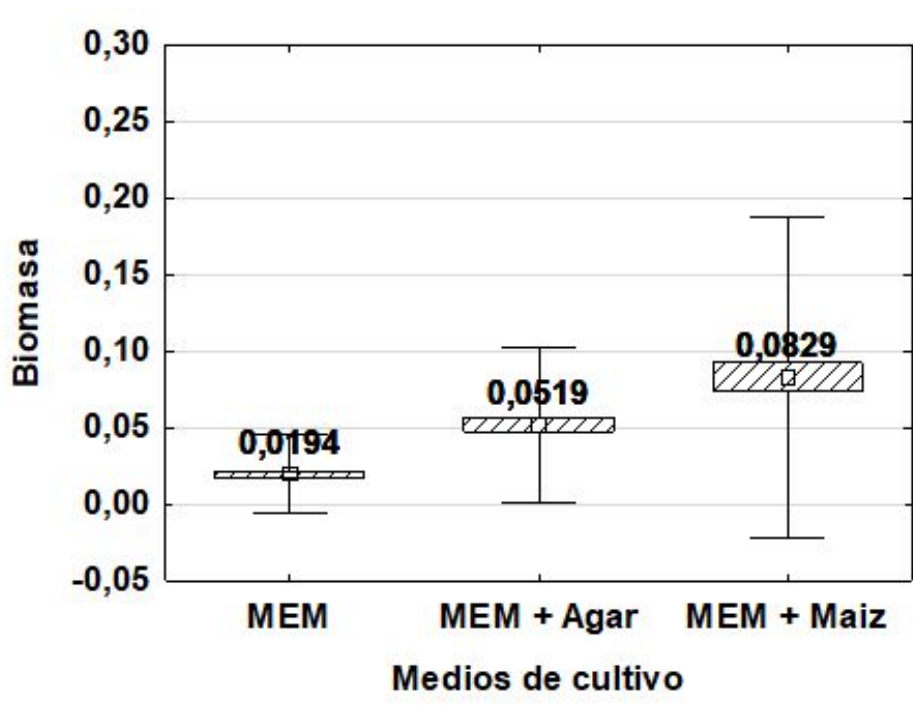


Según (Álvarez Poblete y otros, 2018) el cambio de color determina que existe mayor concentración de proteína pasando de celeste a un violeta intenso ya que el activo determina proteínas o péptidos de cadena larga o corta mediante dichas coloraciones.



Resultados y Discusión

Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), medios de cultivo (Factor A)

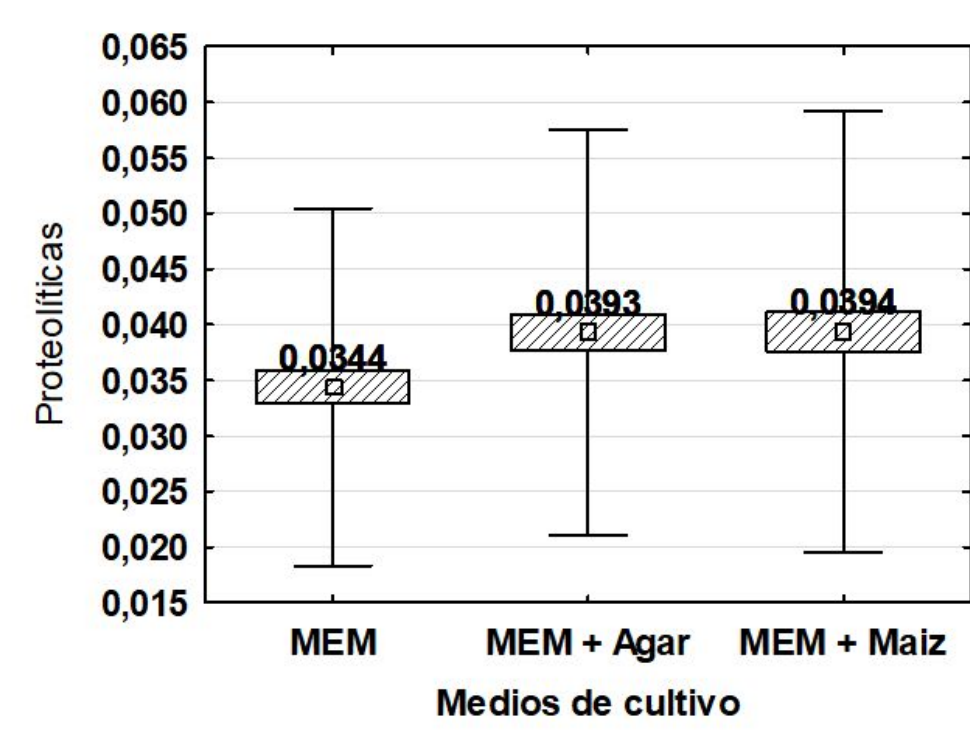


Los resultados obtenidos de biomasa son bajos a los reportados por (León León, 2008), (Duque Vidal & Gutiérrez Beltrán, 2011) establece que la producción de biomasa es favorable cuando el hongo *Penicillium S.P* posee fuentes de nitrógeno orgánicas.



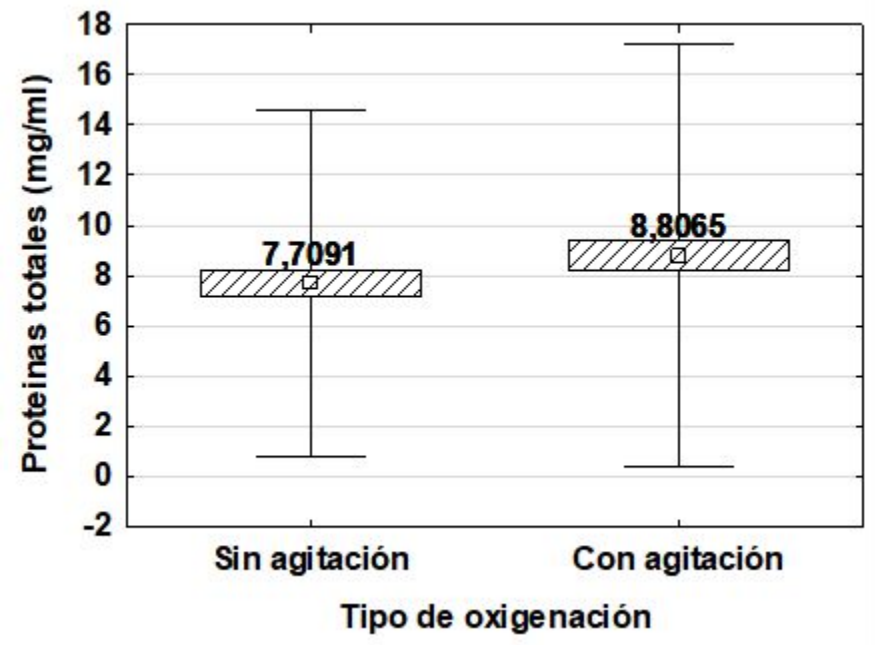
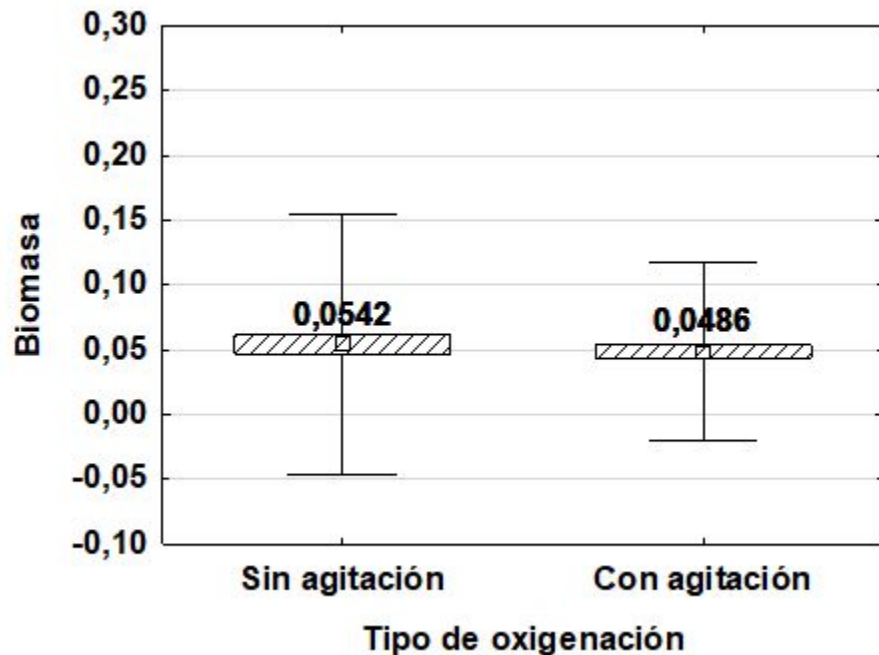
Resultados y Discusión

Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), medios de cultivo (Factor A)



Resultados y Discusión

Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), tipo de oxigenación (Factor B)

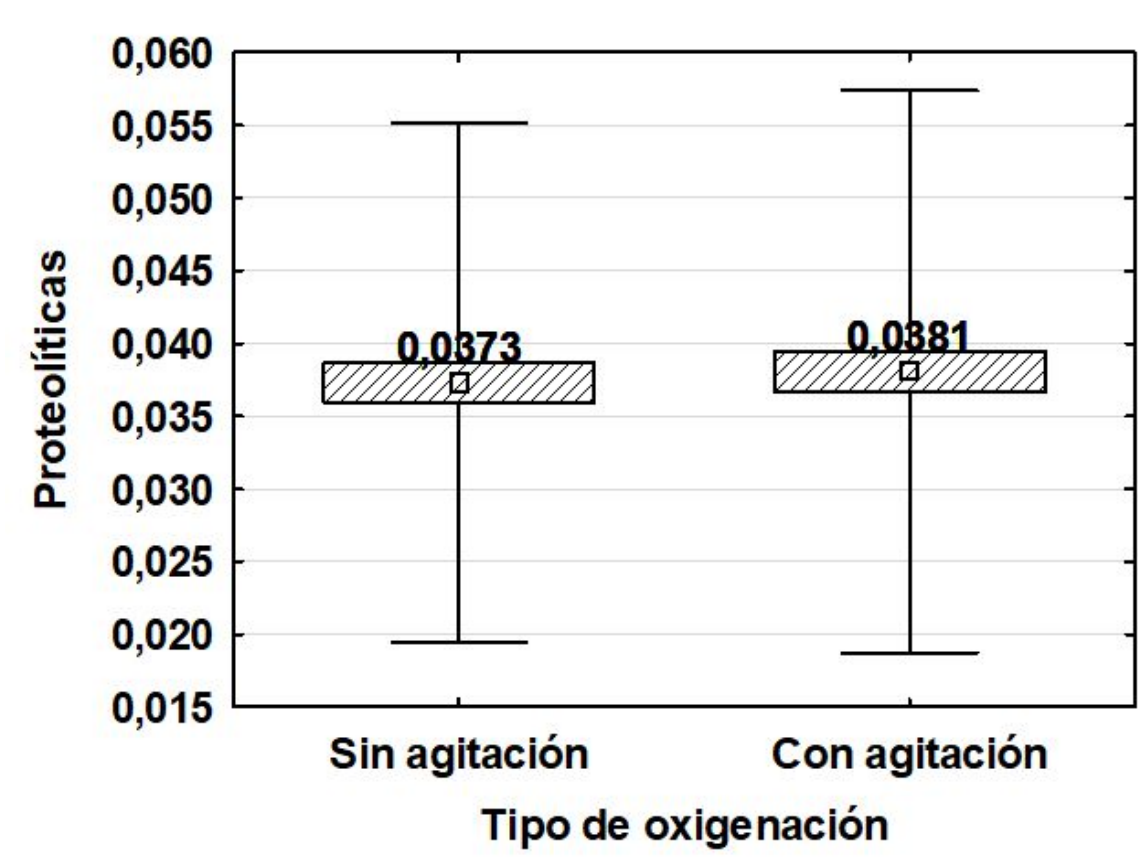


Según (Rebeca, 2015), menciona que los hongos crecen mejor utilizando glucosa que cuando se utiliza lactosa, ya que esta azúcar se hidroliza de manera más lenta debido a una baja actividad de la β -galactosidasa de *Penicillium*.



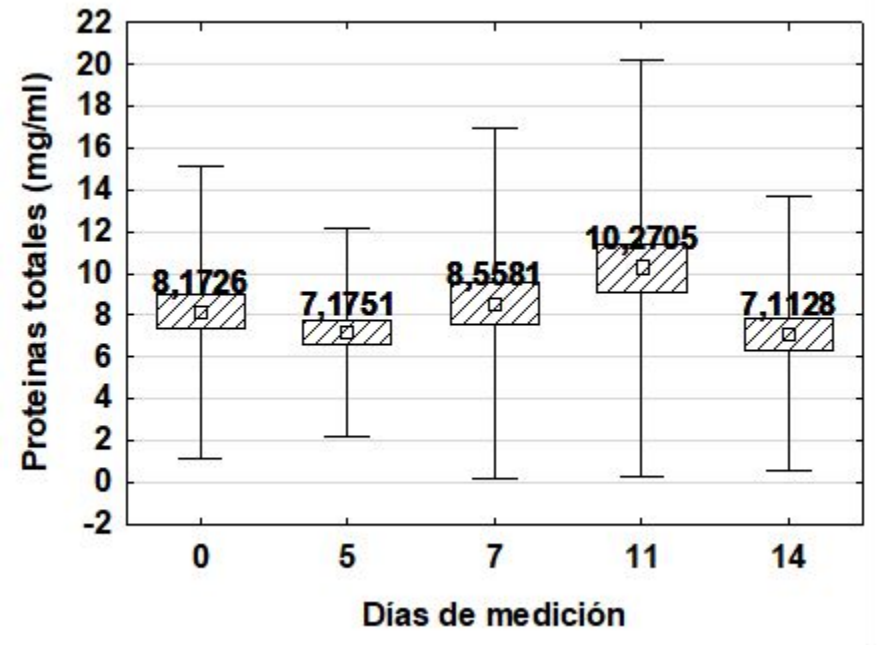
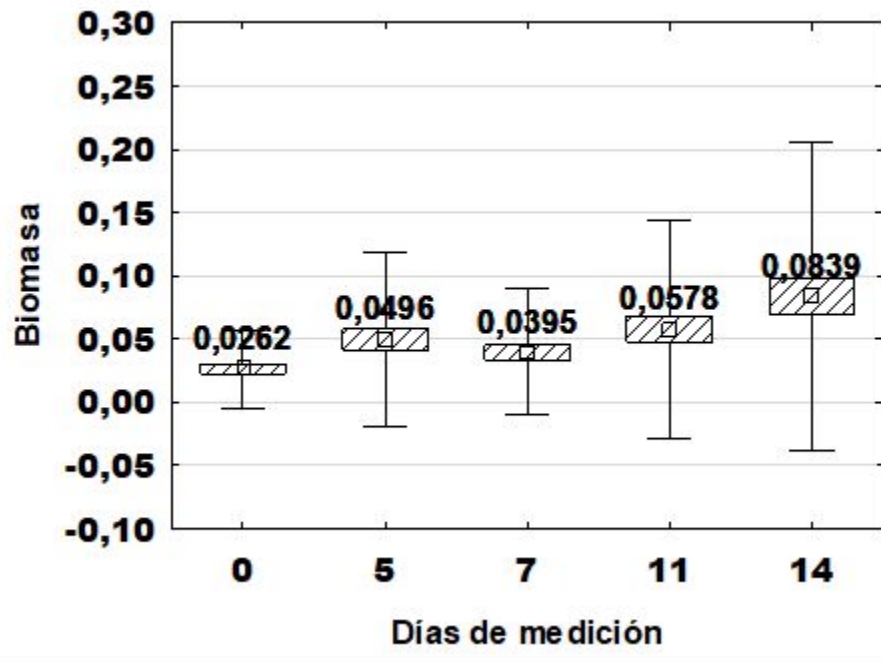
Resultados y Discusión

Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), tipo de oxigenación (Factor B)



Resultados y Discusión

Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), días de medición (Factor C)

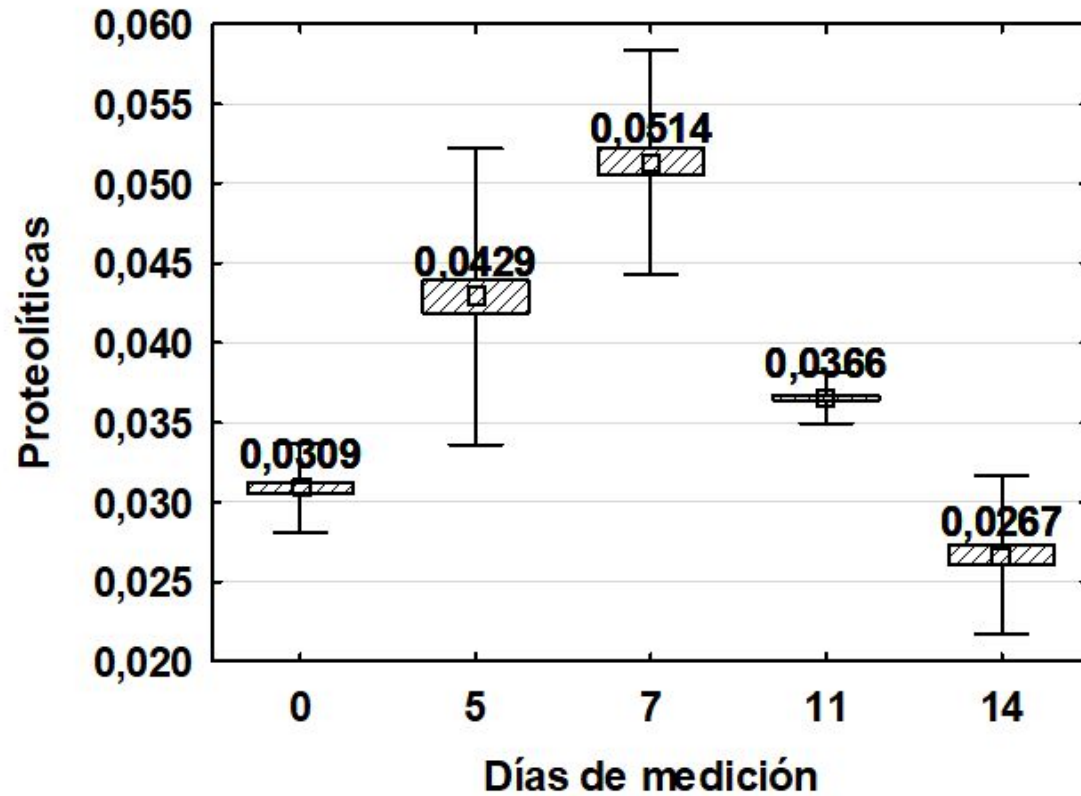


Las proteasas se encargan de asegurar el transporte como la activación de las proteínas expresado en la investigación de (Verhamme y otros, 2018).



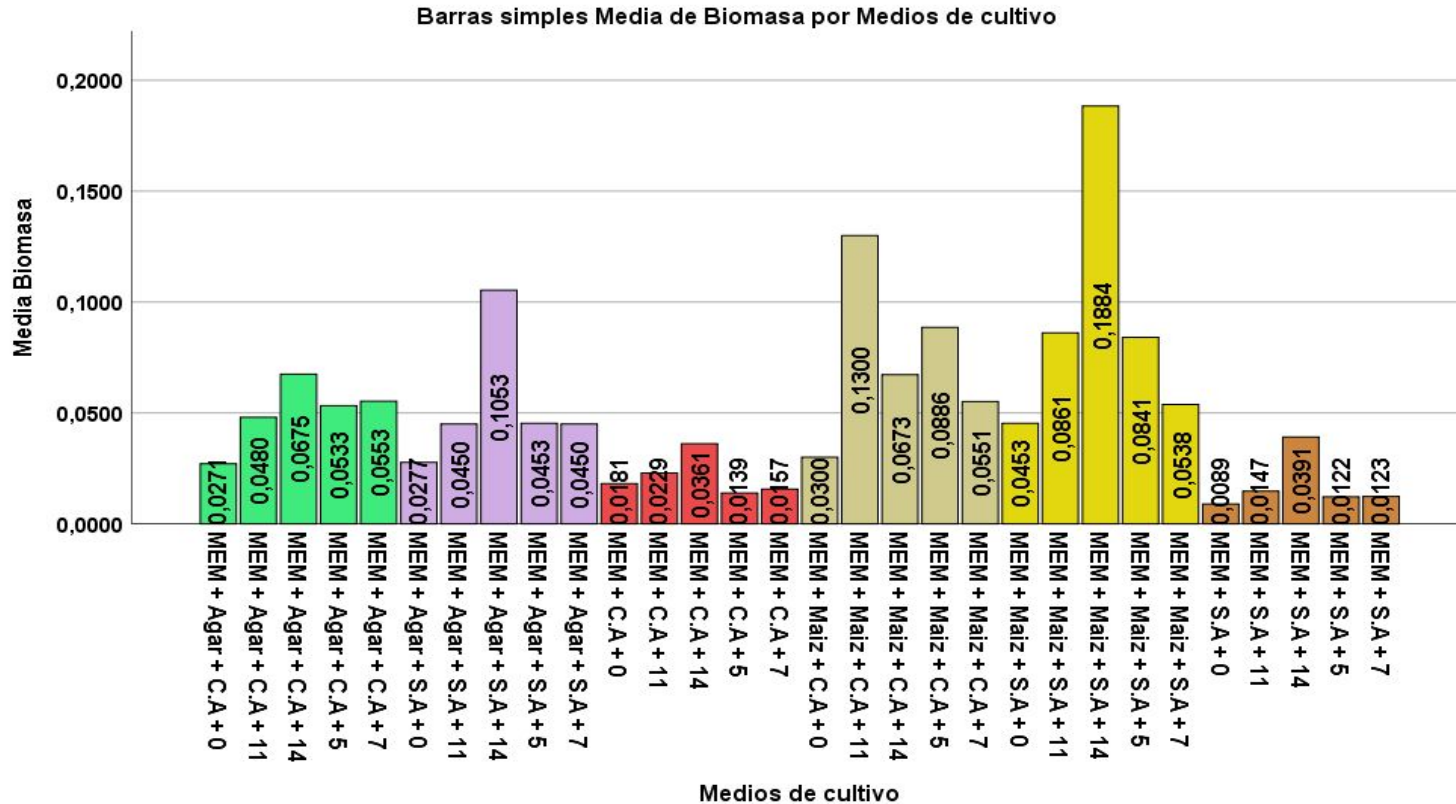
Resultados y Discusión

Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), días de medición (Factor C)



Resultados y Discusión

Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), medios de cultivo*tipo de oxigenación*Días de medición (Factor A*B*C)

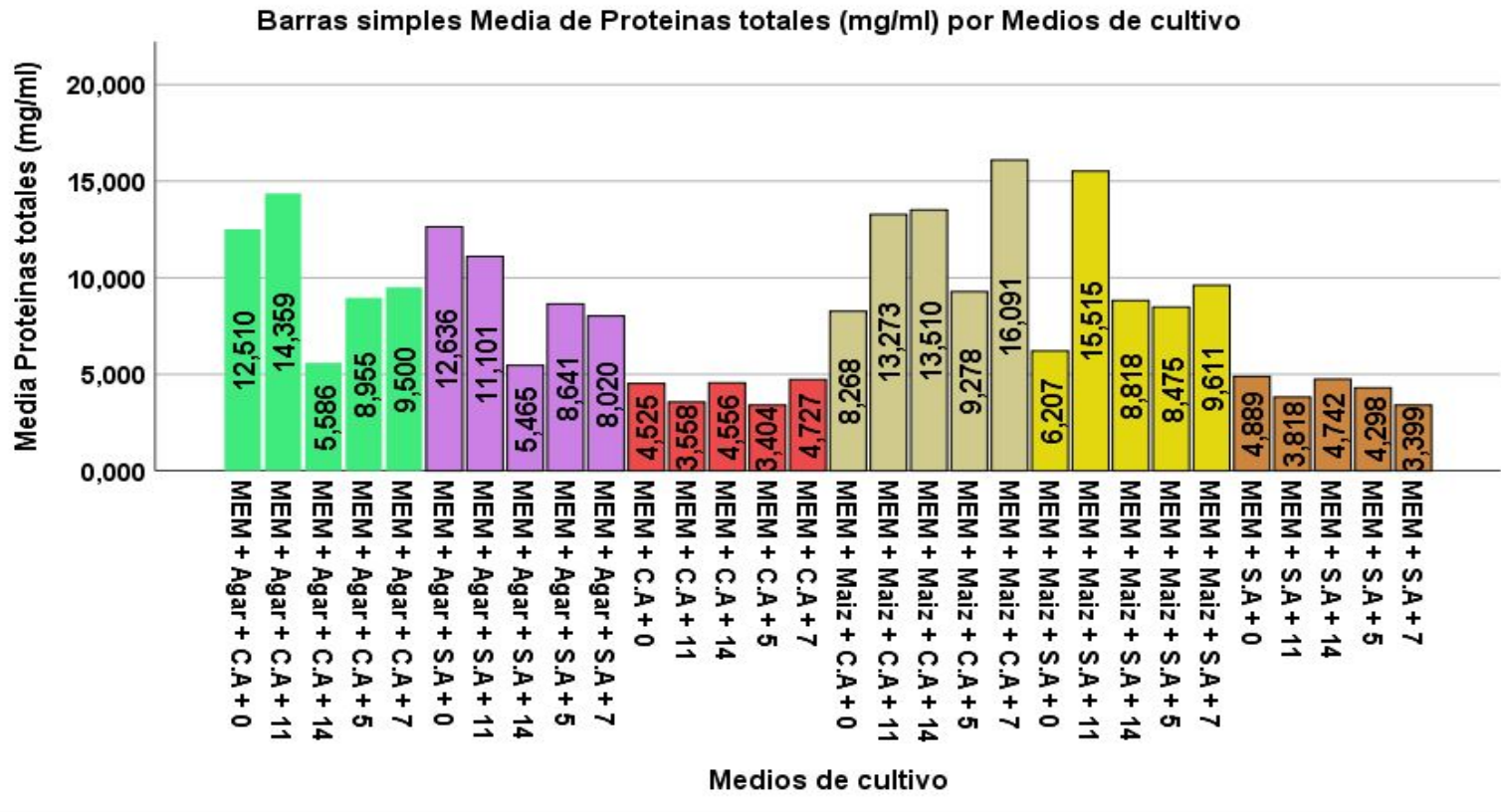


(León León, 2008) y (Parra y otros, 2018) demuestran que la biomasa puede variar según las especies de *Penicillium*. Se obtuvo mejores resultados en el medio de cultivo mínimo enriquecido del maíz sin agitación en el día 14 con un total de 0.1884 g de biomasa.



Resultados y Discusión

Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), medios de cultivo*tipo de oxigenación*Días de medición (Factor A*B*C)

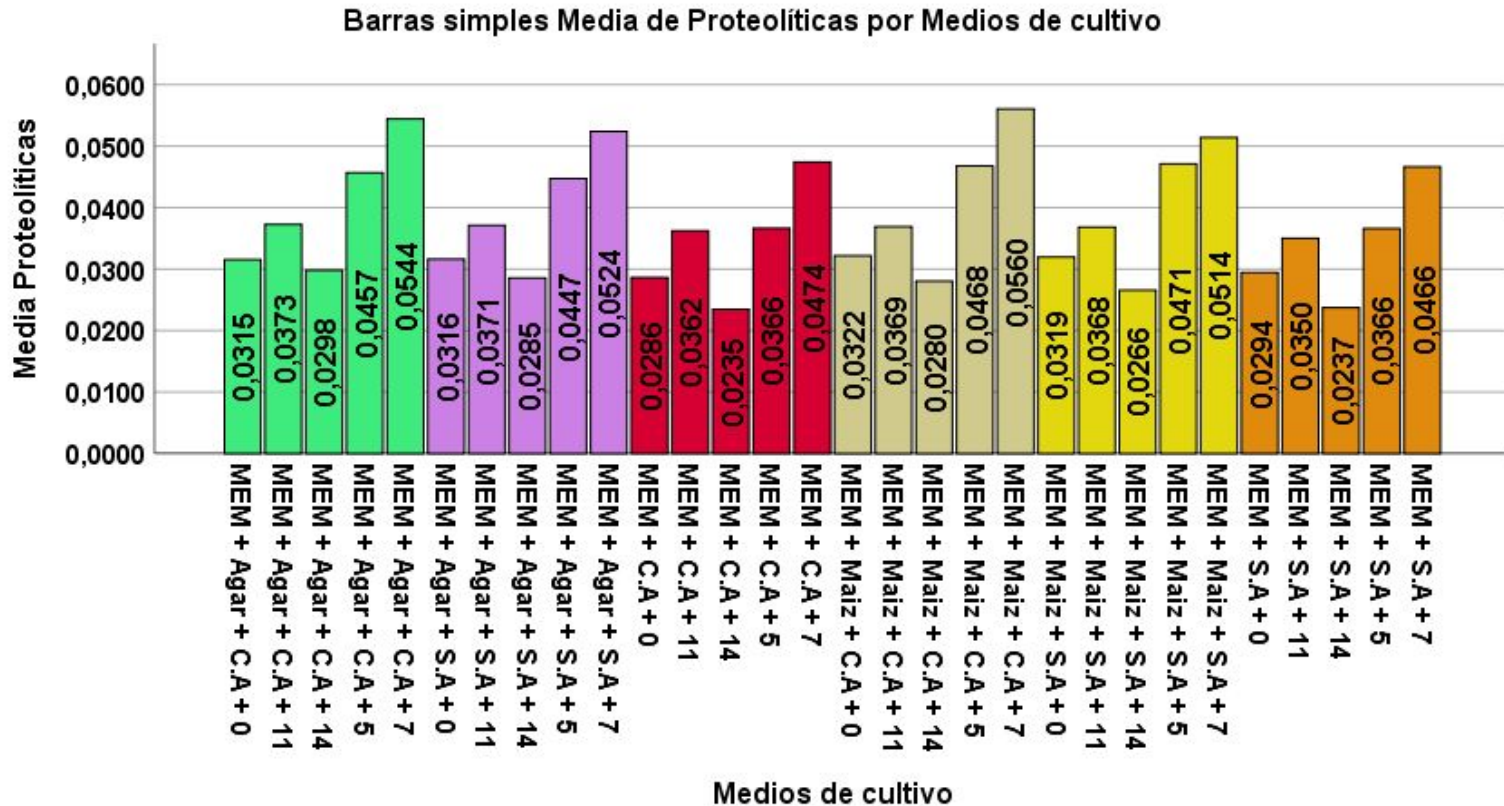


(Canteri & Ghoul, 2015) expresa que el crecimiento de los hongos del género *Penicillium* es afectada por varios factores físicos como el pH, temperatura, aireación y agitación. El medio de cultivo mínimo enriquecido del maíz con agitación posee mejor rendimiento en la obtención de proteínas en tres días siendo el mejor en el día 7.



Resultados y Discusión

Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), medios de cultivo*tipo de oxigenación*Días de medición (Factor A*B*C)



Se observó que los tres medios obtuvieron datos favorables en las dos condiciones con y sin agitación en diferentes días.



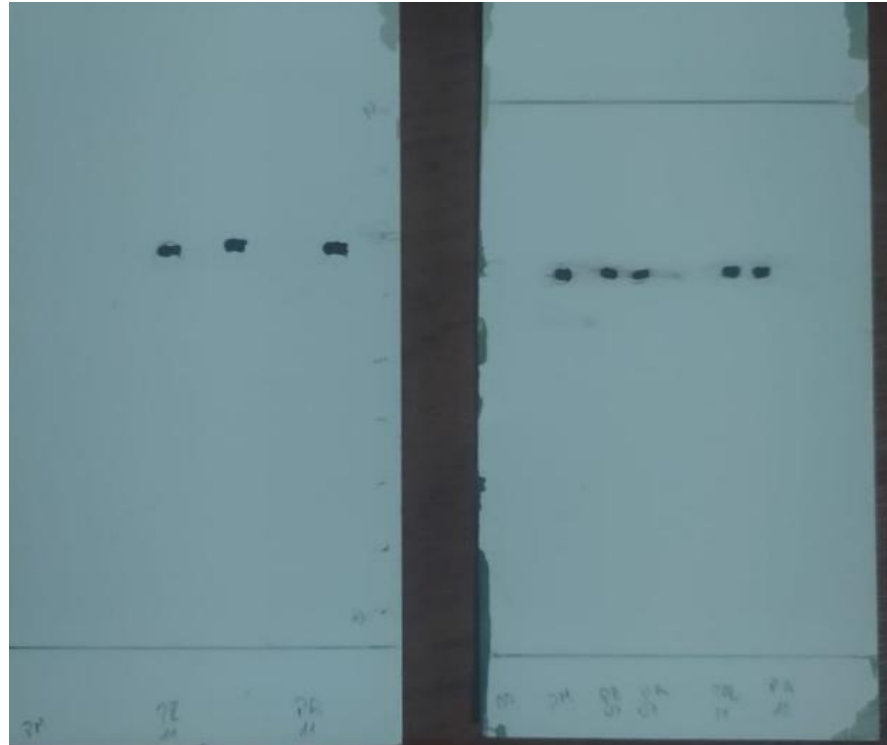
Resultados y Discusión

Purificación de la muestra mediante filtración, centrifugación y sulfato de amonio



Resultados y Discusión

Cromatografía de capa fina de la penicilina comercial y del biofármaco obtenido mediante fermentación del hongo *Penicillium*

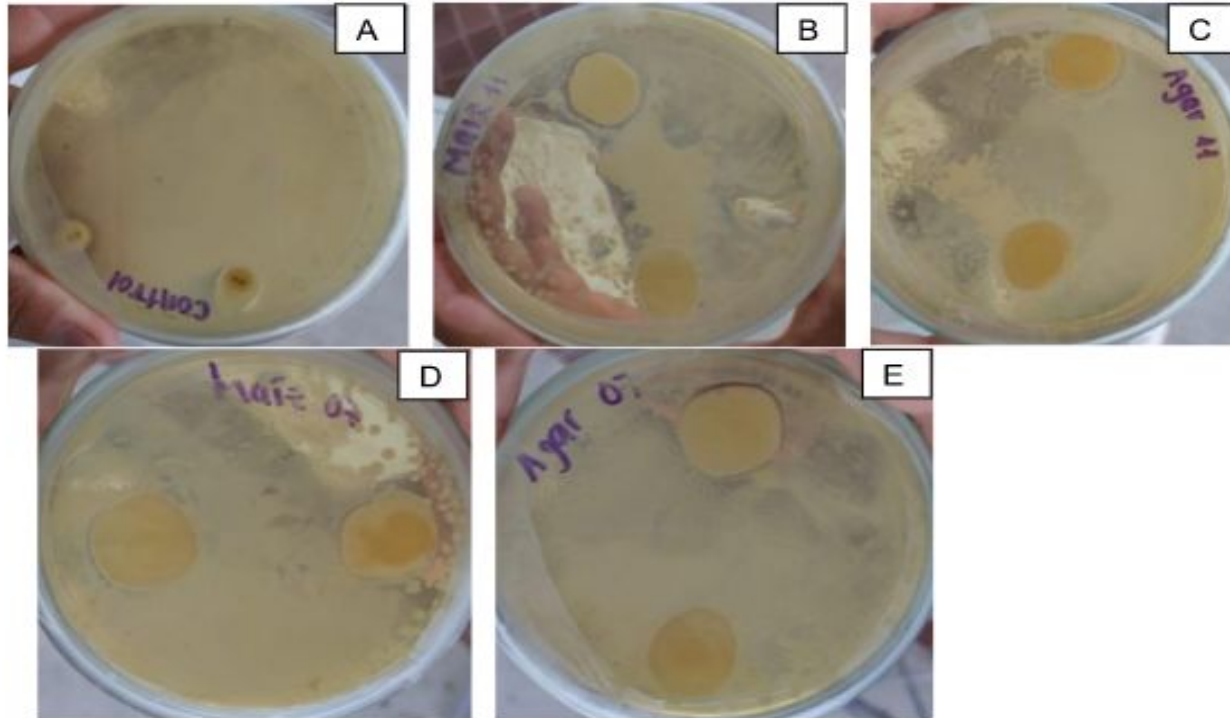


(Castillo y otros, 2007) señala que la cromatografía de capa fina es una opción sencilla y económica, eficiente para realizar el seguimiento al proceso de fermentación.



Resultados y Discusión

Antibiograma del disco de penicilina comercial y biofármaco obtenido mediante fermentación del *Penicillium*



Según (Marín & Gudiol, 2002) las penicilinas son un grupo de antibióticos que tienen la capacidad de inhibir las paredes celulares bacterianas, lo que provoca la muerte de las bacterias.



Resultados y Discusión

Biofármaco encapsulado microencapsulación con alginato



Mediante la solución de cloruro de calcio y el alginato se puede realizar una gelificación del biofármaco, el alginato actúa como gelificante y se usa cloruro de calcio para la esterificación.



Conclusiones

Se obtuvo el biofármaco utilizando un microorganismo patógeno aislado, mediante un proceso de fermentación en un medio de cultivo que contenía carbohidratos.

La producción del biofármaco se determinó mediante la medición de parámetros como la biomasa producida, las proteínas totales y la actividad enzimática, se evidenció la actividad antibacteriana mediante un antibiograma.

Se purificó el biofármaco mediante procesos de precipitación y filtración y encapsulación mediante emulsión iónica, permitiendo así, protegerlo de la degradación y mejorar su estabilización. Por lo cual se puede concluir que fue posible cumplir con todos los objetivos planteados para la obtención del biofármaco utilizando un microorganismo patógeno.



Recomendaciones

Se recomienda usar diferentes fuentes de carbohidratos y diferentes cepas de microorganismos del género *Penicillium* para determinar cuál de estas supera los valores obtenidos.

Se recomienda utilizar el medio de cultivo enriquecido con fuentes de compuestos orgánicos e inorgánicos. La lactosa permite mejorar la producción de penicilina para contrarrestar los efectos negativos de la glucosa.

Se recomienda que en ensayos con hongos del género *Penicillium* se utilicen fuentes de nitrógenos orgánicos ya que estas pueden aportar aminoácidos y evitan que ocurra una oxidación del amoníaco.



*MUCHAS GRACIAS POR SU
ATENCIÓN*



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA