



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

Moyano Gaibor, José Andres.

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología.

BqF. Urbina Salazar, Anabell Del Rocío Ph.D

28 de Febrero del 2023



Departamento de ciencias de la vida y de la agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Obtención de un biofármaco mediante la fermentación de microorganismos patógenos y comprobar su efectividad en cada uno”**, fue realizado por la señor Moyano Gaibor, José Andres, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 28 de Febrero del 2023.

Firma:

.....

BqF. Urbina Salazar, Anabell Del Rocío Ph.D

C. C.: 180415421-7



Departamento de ciencias de la vida y de la agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, Moyano Gaibor, José Andres, con cédula de ciudadanía N° 23005574-6, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Obtención de un biofármaco mediante la fermentación de microorganismos patógenos y comprobar su efectividad en cada uno”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo, 28 de Febrero del 2023.

Firma

.....
Moyano Gaibor, José Andres

C.C.: 230055741-6



Departamento de ciencias de la vida y de la agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo Moyano Gaibor, José Andres, con cédula de ciudadanía N° 230055741-6, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Obtención de un biofármaco mediante la fermentación de microorganismos patógenos y comprobar su efectividad en cada uno”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo, 28 de Febrero del 2023.

Firma

.....

Moyano Gaibor, José Andres

C.C.: 230055741-6

Dedicatoria

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas aquellas personas que han sido parte fundamental en mi vida y en la culminación de este importante proyecto.

A mis abuelos, Teresa Gaibor y José Moyano quienes me criaron y me inculcaron buenos valores desde pequeño; por ser un ejemplo a seguir de perseverancia, amor y sabiduría. Les agradezco de todo corazón por enseñarme que nunca es tarde para aprender y por ser mi apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A mi madre, Mariela Moyano, que a pesar de la distancia ha roto fronteras demostrándome su amor inquebrantable, su dedicación y sacrificios para brindarme una educación y una vida digna. Gracias por ser mi guía y mi inspiración en todo momento.

A mi tío-hermano, Darwin Moyano, y hermana, Karol Lopez, gracias por ser mi apoyo y mi guía en todo momento. Su ejemplo ha sido fundamental para mí y me has demostrado que, con esfuerzo y dedicación, todo es posible.

A mi enamorada, Katherine Luna, por tu paciencia, tu amor y tu dedicación. Has sido mi apoyo en los momentos más difíciles y un pilar fundamental en mi vida. Juntos hemos luchado y hemos soñado, y gracias a ti, he alcanzado este importante logro.

A mis amigos, por llenar mi vida de risas, aventuras y momentos inolvidables. Gracias por estar siempre a mi lado, por escucharme, apoyarme y compartir conmigo las alegrías y tristezas de la vida.

Finalmente, a mis docentes, Anabell Urbina y Renato Inca, por su paciencia, pasión y compromiso en mi formación académica. Gracias por enseñarme a pensar críticamente, a ser perseverante y a buscar siempre la excelencia.

¡Siempre llevaré en mi corazón este momento tan especial y su valioso aporte a mi formación personal y profesional!

Con mucho cariño, José Andres Moyano Gaibor

Agradecimiento

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis abuelos, padres, amigos y docentes por el apoyo incondicional que me han brindado durante todo el proceso académico .

Sus palabras de aliento, su motivación constante, sus consejos y enseñanzas han sido fundamentales para alcanzar esta meta tan importante. Gracias a su amor, paciencia y dedicación, he sido capaz de superar los momentos de frustración, los obstáculos y las dudas que surgieron en el camino.

A mis docentes y laboratoristas, Armando Reina PhD, Ing. Mariela Valdivieso, Ing. Jhoan Plua, Ing. Katty Medina, Ing. Francisco Suasnavas, Ing. Fausto Bedoya por su dedicación, por transmitirme su pasión por el conocimiento y por brindarme su valiosa orientación y ayuda en cada etapa de este proceso.

A mis amigos, Diana M, Diana H, Deivis T, Genecys R, María B, Jonny M, Evelyn C, Alejandra T, Boris T, Kevin C, por su amistad, su compañía y su apoyo constante, por animarme cuando más lo necesitaba y por compartir conmigo los buenos y malos momentos.

A Pedro David Puente por ser un peldaño importante a lo largo de la carrera compartiendo su enseñanza y carisma a sus estudiantes motivándolos a ser mejores con sus consejos.

Cada uno de ustedes ha dejado una huella imborrable en mi vida y en este logro que hoy celebro. Les agradezco de todo corazón por haber estado a mi lado en este camino y por ser parte de esta historia que nunca olvidaré.

José Andres Moyano Gaibor

Índice de contenido

Caratula.....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de tablas	14
Índice de figuras	16
Resumen.....	17
Abstract.....	18
Capítulo I.....	19
Introducción.....	19
Justificación	21
Objetivos.....	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos.....	23
Hipótesis	23
Hipótesis para Factor A	23
Hipótesis para Factor B	23
Hipótesis para Factor C.....	23
Capítulo II.....	24
Revisión bibliográfica.....	24

Biofármacos.....	24
Clasificación de los biofármacos	25
Sistema de clasificación	25
Límites de la clase.....	27
Los criterios recomendados por la guía BCS de la USFDA:	30
Obtención de un biofármaco	31
Sistemas para la Producción de Biofarmacéuticos	31
1. Sistema de expresión de mamíferos.....	31
2. Sistema de expresión bacteriano.....	32
3. Sistema de expresión de levadura.....	33
4. Sistema de expresión de líneas celulares de insectos	34
5. Sistema de expresión vegetal.....	34
Clasificación de los antibióticos.....	36
Clasificación de los antibióticos sobre la base de la estructura química:	36
Clasificación de los antibióticos según su origen: Origen microbiano	36
Clasificación de los antibióticos sobre la base del rango de actividad (espectro de actividad):	37
Espectro estrecho:.....	37
Espectro moderado:	37
Espectro estrecho-amplio:	37
Amplio espectro:.....	37
Antibióticos antimicobacterianos:.....	38
Capítulo III.....	39

	10
Metodología.....	39
Ubicación del área de investigación	39
Ubicación política	39
Ubicación ecológica	39
Ubicación geográfica.....	39
Materiales y métodos	41
Obtención del microorganismo.....	41
Aislación y siembra del microorganismo (<i>Penicillium</i>)	41
Identificación del microorganismo	42
Tinción de azul de metileno	43
Materiales:.....	43
Tinción de lactofenol.....	43
Materiales:.....	43
Fermentación.....	44
Medio enriquecido mínimo (MEM)	44
Materiales:.....	44
Preparación de medios	45
Materiales:.....	45
Preparación del buffer para siembra	46
Materiales:.....	46
Siembra del microorganismo <i>Penicillium</i>	47
Materiales:.....	47
Incubación de los medios de cultivos	48

Materiales:.....	48
Toma de muestras de los medios de cultivos fermentados	48
Materiales:.....	48
Determinación de la biomasa producida	49
Materiales:.....	49
Determinación de la cuantificación de proteínas	49
Método de Biuret.....	50
Determinación de la actividad Proteolítica.....	52
Materiales:.....	53
Preparación del buffer de fosfato 50 mM	53
Purificación	54
Filtración.....	54
Materiales:.....	54
Precipitación y filtración.....	55
Materiales:.....	55
Sulfato de amonio	55
Materiales.....	55
Cromatografía de capa fina (CCF)	56
Materiales:.....	56
Antibiograma.....	57
Materiales:.....	57
Microencapsulación con alginato	59
Diseño experimental.....	60

	12
Factores y niveles de estudio.....	60
Tratamientos a comparar	60
Tipo de diseño	62
Capitulo IV.....	63
Resultados	63
Obtención del microorganismo.....	63
Aislación y siembra del microorganismo (<i>Penicillium</i>)	64
Identificación del microorganismo	64
Tinción de azul de metileno	65
Tinción de azul de lactofenol	65
Medios de cultivo (liquido).....	66
Medición de proteínas mediante el método de Biuret.....	68
Análisis de varianza	69
Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), medios de cultivo (Factor A)	72
Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), tipo de oxigenación (Factor B)	74
Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), días de medición (Factor C).....	76
Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), medios de cultivo*tipo de oxigenación*Días de medición (Factor A*B*C)	78
Purificación	85
Cromatografía de capa fina.....	86
Antibiograma.....	87
Microencapsulación con alginato.	89
Capitulo V.....	90

Discusión.....	90
Respecto a la aislación e identificación del hongo <i>Penicillium</i>	91
Respecto al medio de cultivo	92
Capítulo VI	98
Conclusiones.....	98
Recomendaciones.....	100
Capitulo VII.....	101
Bibliografía	¡Error! Marcador no definido.

Índice de tablas

Tabla 1 Materiales para la aislación y siembra del hongo <i>Penicillium</i>	41
Tabla 2 Equipos, insumos y reactivos utilizados en la identificación microscópica del microorganismo (hongo <i>Penicillum</i>) mediante azul de metileno.	43
Tabla 3 Equipos, insumos y reactivos utilizados en la identificación microscópica del microorganismo (hongo <i>Penicillum</i>) mediante azul de lactofenol.	43
Tabla 4 Equipos, insumos y reactivos para la elaboración del medio enriquecido mínimo (MEM).	44
Tabla 5 Equipos, insumos, reactivos y muestras para la preparación de los diferentes medios.	45
Tabla 6 Equipos, insumos y reactivos para la preparación del buffer para la siembra de hongo <i>Penicillium</i>	46
Tabla 7 Equipos, insumos, reactivos, y muestras para la siembra del hongo <i>Penicillium</i>	47
Tabla 8 Equipos para la incubación de los medios de cultivo	48
Tabla 9 Equipos, insumos, y muestras para la toma de muestras de los medios de cultivos fermentados.....	48
Tabla 10 Equipos y muestras para la determinación de la biomasa.....	49
Tabla 11 Equipos, insumos, reactivos, y muestras para la cuantificación de proteínas por el método de Biuret.....	50
Tabla 12 Valores de la curva patrón de calibración.....	51
Tabla 13 Equipos, insumos, reactivos, y muestras para la determinación de la actividad proteolítica.	53
Tabla 14 Insumos y muestras para el proceso purificación mediante filtración	54
Tabla 15 Equipos, insumos y muestras para la purificación mediante precipitación y filtración	55
Tabla 16 Equipos, insumos, reactivos, y muestras para la purificación mediante sulfato de amonio y precipitación	55
Tabla 17 Equipos, insumos, reactivos, y muestras para cromatografía de capa fina (CCF)	56

Tabla 18 Equipos, insumos, reactivos, y muestras para la elaboración del antibiograma ...	57
Tabla 19 Insumos, reactivos, y muestras para la encapsulación mediante emulsión iónica	59
Tabla 20 Análisis de Varianza para Biomasa (Absorbancia).....	69
Tabla 21 Análisis de Varianza para Proteínas totales (mg/ml)	70
Tabla 22 Análisis de Varianza para Proteolíticas	71
Tabla 23 Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$) para Medios de cultivo (Factor A)	72
Tabla 24 Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), Tipo de oxigenación (Factor B)	74
Tabla 25 Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), Días de medición (Factor C)	76
Tabla 26 Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), medios de cultivo*tipo de oxigenación*Días de medición (Factor A*B*C).....	78

Índice de figuras

Figura 1 Mapa de ubicación geográfica del área de investigación	40
Figura 2 Curva patrón de calibración de la concentración de 1 a 10 mg/ml de BSA.	52
Figura 3 Desarrollo macroscópico de las colonias del hongo <i>Penicillium</i>	63
Figura 4 Desarrollo de la obtención de la cepa pura del hongo <i>Penicillium</i>	64
Figura 5 Identificación microscópica del hongo <i>Penicillium</i> por azul de metileno	65
Figura 6 Identificación microscópica del hongo <i>Penicillium</i> por lactofenol	65
Figura 7 Identificación morfológica del crecimiento del hongo <i>Penicillium</i> en caldo	66
Figura 8 Crecimiento del hongo del género <i>Penicillium</i> en los diferentes medios de cultivo y condiciones.....	67
Figura 9 Toma de datos mediante el método de Biuret para proteínas totales	68
Figura 10 Efecto de los medios de cultivo sobre las variables.....	72
Figura 11 Efecto del tipo de oxigenación sobre las variables	75
Figura 12 Efecto de los días de medición sobre las variables	77
Figura 13 Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), medios de cultivo*tipo de oxigenación*Días de medición (Factor A*B*C).....	80
Figura 14 Dendrograma entre las variables.....	84
Figura 15 Purificación de la muestra mediante filtración, centrifugación y sulfato de amonio	85
Figura 16 Cromatografía de capa fina de la penicilina comercial y del biofármaco obtenido mediante fermentación del hongo <i>Penicillium</i>	86
Figura 17 Antibiograma del disco de penicilina comercial y biofármaco obtenido mediante fermentación del <i>Penicillium</i>	87
Figura 18 Antibiograma al tercer día de los días 5 y 14 del biofa producido por el agar y maíz.....	88
Figura 19 Biofármaco encapsulado microencapsulación con alginato	89

Resumen

Muchos productos biofarmacéuticos y biológicos se basan en la fermentación de diferentes tipos de células, utilizando microorganismos patógenos es bastante factible y económicamente viable por su capacidad de desarrollo en diferentes medios y ambientes. La biosíntesis de penicilina por *Penicillium* es uno de los procesos biológicos mejor caracterizados desde el punto de vista genético, molecular, bioquímico y subcelular. El objetivo de esta investigación fue obtener y caracterizar un biofármaco del hongo del género *Penicillium*, a partir de distintos medios de cultivo y condiciones, determinando su eficacia contra la sensibilidad bacteriana mediante antibiograma, el desarrollo de la investigación se lo realizó en los diferentes laboratorios de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo donde se aisló, cultivo e identificó el hongo del género *Penicillium* por microscopia de su morfología, se planteó un diseño factorial con 3 factores (AxBxC) y 3 réplicas, usando y la prueba de significancia de Tukey ($p < 0,05$) para evaluar la biomasa, proteínas totales y la actividad enzimática de las proteasas del hongo en diferentes medios de cultivos obteniendo mayor producción en el maíz en los diferentes días para biomasa (0.1884 g) en el día 14 S.A, mientras que para proteínas totales (16.091 mg/ml) en día 7 C.A y para la actividad proteolítica (0.0560 UI/ml) en día 7 C.A, mientras que el medio con PDA no obtuvo datos favorables, con respecto a la evaluación del biofármaco mediante el antibiograma se determinó que existía una mayor resistencia bacteriana en día 7 y 11 y al hacer la prueba de cromatografía de capa fina con penicilina comercial y el biofármaco se determinó que recorrían la misma distancia obteniendo un Rf de 0.83 por lo que se dedujo que entre sus compuestos existían cadenas betalactámicas en cada una de las muestras.

Palabras clave: Biofármaco, Penicillium, Cadenas betalactámicas, Proteasas.

Abstract

Many biopharmaceutical products are based on the fermentation of different types of cells, using pathogenic microorganisms that are quite feasible and economically viable due to their ability to develop in different media and environments. Penicillin biosynthesis by *Penicillium* is one of the best characterized biological processes from the genetic, molecular, biochemical and subcellular point of view. The objective of this research was to obtain and characterize a biopharmaceutical from the fungus of the genus *Penicillium*, from different culture media and conditions, determining its efficacy against bacterial sensitivity by antibiogram, the development of the research was carried out in different laboratories of the University of the Armed Forces ESPE Santo Domingo headquarters where the fungus of the genus *Penicillium* was isolated, cultivated and identified by microscopy of its morphology, a factorial design with 3 factors (AxBxC) and 3 replicates was proposed, using and the significance test of Tukey ($p < 0.05$) to evaluate the biomass, total proteins and the enzymatic activity of the proteases of the fungus in different culture media, obtaining higher production in corn on the different days for biomass (0.1884 g) on day 14 S.A. , while for total proteins (16.091 mg/ml) on day 7 CA and for proteolytic activity (0.0560 IU/ml) on day 7 CA, while the medium with PDA did not obtain favorable data, regarding the evaluation of the biopharmaceutical by means of the antibiogram it took until there was a greater bacterial resistance on days 7 and 11 and when doing the thin layer chromatography test with commercial penicillin and the biopharmaceutical it took them to travel the same distance obtaining an Rf of 0.83, therefore It was deduced that beta-lactam chains existed among their compounds in each of the samples.

Keywords: Biopharmaceutical, Penicillium, Beta-lactam chains, Proteases.

Capítulo I

Introducción

Muchos productos biofarmacéuticos y biológicos se basan en la fermentación de diferentes tipos de células. Los productos biofarmacéuticos pueden ser metabolitos intracelulares o extracelulares que tienen un efecto farmacológico. En este sentido, la fermentación, en su conjunto, incluye procesos de etapas múltiples de buenas prácticas de fabricación (GMP) aguas arriba y aguas abajo cuyo propósito es producir el material terapéutico biofarmacéutico requerido que es puro y activo, y que se libera de acuerdo con los estándares y especificaciones de calidad relevantes (Ostos Ortíz y otros, 2019).

La biosíntesis natural de moléculas endógenas implica rutas complejas específicas de varios pasos, algunas de las cuales pueden manipularse para la biosíntesis de moléculas extrañas. Los microorganismos pueden modificarse genéticamente (tecnología recombinante) o manipularse metabólicamente mediante una alteración sustancial de sus rutas endógenas. Los elementos clave del desarrollo de la fermentación son la selección y optimización de cepas, el desarrollo de medios y procesos y, finalmente, la ampliación para maximizar la productividad (López y otros, 2018). El procesamiento posterior utiliza varias tecnologías para extraer, concentrar y purificar el producto de un caldo de fermentación diluido.

La diversidad de productos derivados de la fermentación (la recuperación y purificación selectiva del producto deseado específico de todo el repertorio molecular) hace que la tecnología de fermentación sea una metodología multidisciplinaria que abarca la microbiología, la química orgánica, la bioquímica y la biología molecular. La fermentación puede comenzar utilizando células genéticamente modificadas o no modificadas, como bacterias, hongos, plantas y material de mamíferos. Por lo general, los procesos de fermentación a gran escala se realizarán en biorreactores de acero inoxidable o de un solo uso (para obtener más información sobre los reactores de un solo uso, consulte el equipo de un solo uso en la industria biofarmacéutica).

La biosíntesis de penicilina por *Penicillium chrysogenum* es uno de los procesos biológicos mejor caracterizados desde el punto de vista genético, molecular, bioquímico y subcelular. Durante la última década se han llevado a cabo varios estudios ómicos en este hongo filamentoso, que han contribuido a obtener un conocimiento profundo sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la mejora de la productividad en cepas industriales (Svahn, 2015). La molécula de penicilina se sintetiza a partir de los aminoácidos precursores ácido α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina. No están condensados ribosómicamente por la gran proteína multifuncional L- δ (α -aminoadipilo)-L-cisteinil-D-valina (ACV) sintetasa (ACVS) (codificada por el gen *pcbAB* de 11 kpb), que requiere activación por parte de la adición del brazo 4'-fosfopanteteína derivado de CoA en una reacción catalizada por la proteína auxiliar fosfopanteteinil transferasa (Carsanba y otros, 2021).

La regulación y el control de la biosíntesis y producción de penicilina han sido objeto de un profundo estudio para optimizar los títulos de penicilina. Es bien sabido que la producción de penicilina se produce, preferentemente, en condiciones de estrés nutricional y baja tasa de crecimiento. La disponibilidad de carbono, nitrógeno o fósforo, junto con otros factores (pH, aireación, ciertos aminoácidos o composición del medio) tienen una fuerte influencia en el proceso de producción. La biosíntesis de penicilina está regulada por mecanismos complejos controlados por diferentes reguladores (Ariyo y otros, 1998).

Justificación

Los productos biofarmacéuticos son cada vez más relevantes en la medicina moderna porque se pueden producir de manera eficiente, con baja toxicidad y menores costos de producción en comparación con los fármacos sintéticos, lo cual ha permitido satisfacer la creciente demanda (Sharma y otros, 2021). Producir biofármacos utilizando microorganismos patógenos es bastante factible y económicamente viable debido a que estos tienen la capacidad de crecer en casi cualquier tipo de sustrato, permitiendo así obtener metabolitos con actividad farmacológica de forma bastante rápida y económica (Izquierdo Poma & Ramirez Camarena, 2019).

Al igual que las plantas, los hongos y bacterias poseen la capacidad natural de generar metabolitos secundarios los cuales según (Pham y otros, 2019), han permitido obtener distintos agentes médicos para elaborar fármacos anticancerígenos, antimicrobianos, antiinflamatorios e inmunosupresores y es por ello que hoy en día más de la mitad de los medicamentos de molécula pequeña aprobados y agentes antimicrobianos son de origen biológico.

La biotecnología fúngica ha permitido que estas últimas décadas la biotecnología industrial haya florecido y avanzado a gran velocidad, siendo el pilar principal de una industria multimillonaria responsable elaboración de diversas biomoléculas (Cairns y otros, 2018). Debido a sus propiedades y características, los hongos han sido bastante estudiados para la obtención de biofármacos mediante procesos de fermentación, misma que se puede llevar a cabo tanto a pequeñas como a grandes escalas con condiciones de cultivo bastante ajustables, ya que, a diferencia de las bacterias, pueden llegar a soportar condiciones extremas de pH, temperatura, salinidad y carencia de nutrientes (Pham y otros, 2019).

Es por ello que el objetivo del presente estudio es obtener un biofármaco a partir de un microorganismo patógeno y evaluar (o comparar) -su efectividad- (mediante modelos experimentales). Para lo cual, se busca aislar y purificar un hongo y realizar una fermentación, en la cual se obtendrá el biofármaco, mismo que será purificado y encapsulado mediante emulsión iónica.

Utilizar microorganismos permite producir biofármacos a escalas muy grandes, ya que estos son usados como biofábricas y se pueden emplear sustratos muy económicos en estos procesos, lo que permite que se pueda llevar a cabo en países con recursos económicos bastante limitados, permitiendo así, satisfacer la demanda de algunos medicamentos (López, Suarez y Casco, 2018).

Además, la producción de biofármacos es una forma de bioeconomía que permite aprovechar recursos obtenidos de la naturaleza para satisfacer las necesidades y generar recursos económicos. Según Hernandez y Céspedes (2020), la bioeconomía permite mejorar la calidad de vida de muchas personas mediante la generación de productos, puede ayudar a desarrollar económicamente a los países y está presente desde hace mucho tiempo entre nosotros, sin embargo, por temor y desconocimiento no hemos sabido aprovechar todo su potencial. Por ello es importante que se realicen este tipo de estudios, en los cuales se obtienen productos a partir del uso de microorganismos.

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 en medios de cultivo ricos.

Purificar el biofármaco mediante precipitación y filtración.

Encapsular el biofármaco mediante emulsión iónica.

Hipótesis

Hipótesis para 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.

Hipótesis para 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.

Hipótesis para Factor C

Ho: El tiempo de tomas de datos no influye en la obtención del biofármaco.

Ha: El tiempo de tomas de datos influye en la obtención del biofármaco.

Capítulo II

Revisión bibliográfica

Biofármacos

Los productos biofarmacéuticos representan algunos de los mejores logros de la ciencia moderna. Estos fármacos se utilizan cada vez más en prácticamente todas las ramas de la medicina y se han convertido en una de las modalidades de tratamiento clínico más eficaces para una amplia gama de enfermedades, incluidos los cánceres y los trastornos metabólicos. El término “biofarmacéuticos” fue acuñado en la década de 1980 y se refiere a los productos farmacéuticos producidos en procesos biotecnológicos utilizando métodos de biología molecular. Por lo tanto, este grupo de productos se distinguió de la amplia categoría de productos biológicos, que son productos farmacéuticos producidos mediante métodos biológicos convencionales (Rader, 2008).

Los productos biofarmacéuticos difieren de las drogas sintéticas en todos los aspectos. Las diferencias entre estas dos categorías de medicamentos incluyen la naturaleza del producto, la fuente del principio activo, los criterios de bioequivalencia, la identidad, la estructura, los métodos de fabricación, la composición, la dosificación, la formulación, el manejo, los derechos de propiedad intelectual, las normas legales y la comercialización. Los productos biofarmacéuticos se producen en células vivas, mientras que las drogas sintéticas son productos de procesos químicos. La mayoría de las drogas sintéticas son moléculas pequeñas. Por ejemplo, una molécula de ácido acetilsalicílico está compuesta por 21 átomos. Por el contrario, los productos biofarmacéuticos suelen ser entre 100 y 1000 veces más grandes. El ingrediente farmacéutico activo de dicho fármaco puede contener de 2000 a 25 000 átomos. Los productos biofarmacéuticos también son estructuralmente mucho más complejos debido a la formación de cadenas poliméricas, que varían mucho en su estructura (Misra, 2012).

Clasificación de los biofármacos

Sistema de clasificación

El BCS es un marco científico para clasificar un fármaco basado en su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal. Permite la predicción de la farmacocinética in vivo de la liberación inmediata oral (IR) productos farmacológicos clasificando los compuestos farmacológicos en cuatro clases en función de su solubilidad en relación con la dosis permeabilidad intestinal en combinación con las propiedades de disolución de la forma de dosificación. El interés en este sistema de clasificación se debe en gran parte desde su aplicación en el desarrollo temprano de fármacos y luego en permeabilidad intestinal en combinación con las propiedades de disolución de la forma de dosificación (Matar, 2020).

El interés en este sistema de clasificación se debe en gran parte desde su aplicación en el desarrollo temprano de fármacos y luego en la gestión del cambio del producto a lo largo de su ciclo de vida. En las primeras etapas del desarrollo de fármacos, el conocimiento de la clase de una droga en particular es un factor importante que influye en la decisión de continuar o detener su desarrollo. Por lo tanto, una organización que desee producir formas farmacéuticas orales deseará limitar el desarrollo a moléculas con alto permeabilidad. Cada vez más, estas consideraciones son incorporado desde las primeras fases, con el concepto de diseño basado en propiedades que se utiliza en química combinatoria para apuntar a la producción de compuestos que muestran propiedades óptimas (Niazi & Lokesh, 2021).

Este sistema se considera una herramienta de desarrollo de fármacos que permite estimar las contribuciones de tres factores principales, disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal que afectan la absorción oral de fármacos a partir de formas farmacéuticas orales sólidas. Se introdujo por primera vez en el proceso de toma de decisiones reglamentarias en el documento de orientación sobre formas farmacéuticas orales sólidas de liberación inmediata: ampliación y cambios posteriores a la aprobación (Ming-Kung & Yuan-Chuan, 2018).

Clase I

Los fármacos de esta clase exhiben un alto número de absorción y alto número de disolución. El paso limitante de la velocidad es el fármaco. disolución, y si la disolución es muy rápida, entonces la tasa de vaciado gástrico se convierte en el paso determinante de la tasa. Estos compuestos se absorben bien y su absorción suele ser mayor que la tasa de excreción. Los ejemplos incluyen metoprolol, diltiazem, verapamilo y propranolol (Ku, 2008).

Clase II

Los medicamentos de esta clase tienen un alto número de absorción. pero un número de disolución bajo. La disolución del fármaco in vivo es luego un paso limitante de la velocidad para la absorción, excepto a un nivel muy número de dosis alto. La absorción de los fármacos de clase II es generalmente más lento que para la Clase I y ocurre durante un período más largo período de tiempo. La correlación in vitro-in vivo (IVIVC) suele aceptado para medicamentos de Clase I y Clase II. La biodisponibilidad de estos productos está limitada por sus tasas de solvatación. Por lo tanto, una correlación entre la biodisponibilidad in vivo y la se puede encontrar solvatación in vitro. Ejemplos incluyen glibenclamida, fenitoína, danazol, ácido mefenámico, nifedipina, ketoprofeno, naproxeno, carbamezapina y ketoconazol (Ku, 2008).

Clase III

La permeabilidad del fármaco es el paso limitante de la velocidad del fármaco. absorción, pero el fármaco se solvata muy rápidamente. Estos Las drogas exhiben una gran variación en la tasa y el alcance de absorción de fármacos. Como la disolución es rápida, la variación es atribuible a la alteración de la fisiología y permeabilidad de la membrana en lugar de la forma de dosificación factores Si la formulación no cambia la permeabilidad o el tiempo de duración gastrointestinal, entonces los criterios de Clase I se pueden aplicar. Los ejemplos incluyen cimetidina, ranitidina, aciclovir, neomicina B, atenolol y captopril (Ku, 2008).

Clase IV

Los fármacos de esta clase son problemáticos para la administración oral eficaz. administración. Estos compuestos tienen poca biodisponibilidad. Por lo general, no se absorben bien a través del intestino. mucosa, y se espera una alta variabilidad.

Afortunadamente, los ejemplos extremos de compuestos de Clase IV son la excepción más que la regla, y rara vez se desarrollan y comercializado. Sin embargo, existen varios medicamentos de Clase IV. Los ejemplos incluyen hidroclorotiazida, taxol y furosemida (Ku, 2008).

Límites de la clase

Solubilidad

El límite de la clase de solubilidad se basa en la concentración de dosis más alta de un medicamento que es objeto de una solicitud de bioexención (aprobación de un medicamento sin un estudio de farmacocinética BE). De acuerdo con la guía BCS de la USFDA, una sustancia farmacológica se considera altamente soluble cuando la dosis más alta es soluble en 250 ml o menos de medios acuosos en el rango de pH de 1-7.5. De acuerdo con la guía de la OMS, un API se considera altamente soluble cuando la dosis más alta (si el API aparece en la Lista Modelo de Medicamentos Esenciales de la OMS) o la dosis más alta disponible en el mercado como forma de dosificación sólida oral (si el API no aparece en la Lista Modelo de Medicamentos Esenciales de la OMS) es soluble en 250 ml o menos de medios acuosos en el rango de pH de 1,2-6,8. El perfil de pH-solubilidad del API debe determinarse a 37 °C en medios acuosos (Butler & Dressman, 2010).

De acuerdo a los medios prescritos, se recomienda un mínimo de tres determinaciones repetidas de solubilidad en cada condición de pH. Las recomendaciones iniciales en la Guía BCS sugirieron que la solubilidad debe medirse en un rango de pH de 1.2-7.5. Pero las sucesivas discusiones y publicaciones científicas sugieren que un rango de pH de 1.2 a 6.8 es más apropiado. De acuerdo con la guía BCS de EMEA, un fármaco se considera altamente soluble si la dosis única más alta administrada como formulación IR se disuelve completamente en 250 ml de tampones dentro del rango de pH 1-6.8 a 37 °C.

Esta demostración requiere la investigación en al menos tres tampones dentro de este rango (preferiblemente a pH 1,2, 4,5 y 6,8) y además en el pKa, si está dentro del rango de pH especificado. Se recomienda un mínimo de tres determinaciones repetidas en cada condición de pH (p. ej., método de matraz agitado u otro método justificado). El pH de la solución debe verificarse antes y después de agregar el fármaco a un tampón (Butler & Dressman, 2010).

Permeabilidad

El límite de la clase de permeabilidad se basa indirectamente en el grado de absorción de una sustancia farmacológica en humanos y directamente en las mediciones de la tasa de transferencia de masa a través del intestino humano. Alternativamente, pueden usarse sistemas no humanos capaces de predecir el grado de absorción del fármaco en humanos (p. ej., métodos de cultivo de células epiteliales in vitro). De acuerdo con la guía BCS de la USFDA, en ausencia de evidencia que sugiera inestabilidad en el tracto GI, una sustancia farmacológica se considera altamente permeable cuando se determina que el grado de absorción en humanos es del 90 % o más de una dosis administrada basada en una determinación de balance de masa o en comparación con una dosis de referencia intravenosa. De acuerdo con la guía de la OMS, un API se considera altamente permeable cuando el grado de absorción en humanos es del 85 % o más según una determinación de balance de masa o en comparación con una dosis de comparación intravenosa. La recomendación inicial en la Guía BCS sugería un valor de absorción de 90 % como requisito previo para la clasificación como altamente permeable. Sin embargo, sucesivas discusiones científicas y publicaciones científicas han sugerido relajar el criterio al 85% de absorción para clasificar un API como altamente permeable. Un método de prueba alternativo aceptable para la determinación de la permeabilidad del API podría ser la perfusión intestinal in vivo en humanos. Cuando se utilice este método para estudios de permeación, se debe demostrar la idoneidad de la metodología, incluida la determinación de la permeabilidad en relación con la de un compuesto de referencia cuya fracción de dosis absorbida se haya documentado como mínimo del 85 %, así como el uso de un resultado

negativo. control. De acuerdo con las directrices de EMEA BCS, si un fármaco tiene una absorción lineal y completa, se considera altamente permeable (Butler & Dressman, 2010)..

Disolución

De acuerdo con la guía BCS de la USFDA, se considera que un medicamento IR se disuelve rápidamente cuando no menos del 85 % de la cantidad etiquetada del principio activo se disuelve en 30 minutos, usando el Aparato USP I a 100 rpm (o Aparato II a 50 rpm) en un volumen de 900 ml o menos en cada medio: HCl 0,1 N o fluido gástrico simulado USP sin enzimas; tampón (pH 4,5); y tampón (pH 6,8) o fluido intestinal simulado USP sin enzimas. De acuerdo con la guía BCS de la OMS[6], se considera que un producto de múltiples fuentes (productos farmacéuticamente equivalentes o productos farmacéuticamente alternativos que pueden o no ser equivalentes terapéuticos) se disuelve muy rápidamente cuando no menos del 85 % de la cantidad declarada del principio activo se disuelve en 15 minutos utilizando un aparato de paletas a 75 rpm o un aparato de cesta a 100 rpm en un volumen de 900 ml o menos en cada medio: solución de HCl (pH 1,2); tampón de acetato (pH 4,5); y tampón fosfato (pH 6,8). Se considera que un producto multifuente se disuelve rápidamente cuando no menos del 85 % de la cantidad declarada del fármaco se disuelve en 30 minutos usando un aparato de paletas a 75 rpm o un aparato de canasta a 100 rpm en un volumen de 900 ml o menos en cada uno de los medios: solución de HCl (pH 1,2); tampón de acetato (pH 4,5); y tampón fosfato (pH 6,8). De acuerdo con la guía BCS de EMEA[7], se considera que los productos farmacéuticos se disuelven muy rápidamente cuando se disuelve más del 85 % de la cantidad indicada en la etiqueta en 15 minutos, usando el Aparato I de la USP a 100 rpm (o el Aparato II a 50 rpm) en un volumen de 500 ml en cada uno de los medios: HCl 0,1 N o fluido gástrico simulado sin enzimas; tampón (pH 4,5); y tampón (pH 6,8) o fluido intestinal simulado sin enzimas y se debe demostrar la similitud de los perfiles de disolución (Butler & Dressman, 2010)..

Bioejeciones

El término bioexención se aplica a un proceso regulatorio de aprobación de medicamentos cuando el expediente (solicitud) se aprueba sobre la base de pruebas de

equivalencia distintas de las pruebas de equivalencia in vivo. Bioexención significa obtener una exención para llevar a cabo estudios BA y BE costosos y que requieren mucho tiempo.[22] BCS proporciona bioexenciones para medicamentos de clase I, II y III con algunas especificaciones. Esta exención es para las fases previa y posterior a la aprobación. Las bioexenciones basadas en BCS son aplicables a las formulaciones sólidas de dosificación oral de liberación inmediata que contienen uno o más de los API identificados por el programa de precalificación de medicamentos (PQP) de la OMS para ser elegibles, si los datos requeridos garantizan la similitud del producto farmacéutico presentado. producto y el producto de comparación apropiado. Los productos de comparación utilizados en aplicaciones de bioexención de BCS deben seleccionarse de la lista actual de productos de comparación recomendados por el PQP de la OMS, incluido el producto de combinación de dosis fija apropiado. El Solicitante deberá justificar debidamente el uso de cualquier otro comparador. En el PQP de la OMS, las bioexenciones basadas en la BCS están destinadas únicamente a investigar BE y no se aplican a otros BA o estudios farmacocinéticos (Butler & Dressman, 2010).

Los criterios recomendados por la guía BCS de la USFDA:

El principio activo debe ser altamente soluble y altamente permeable (medicamentos de Clase I)

Un medicamento de liberación inmediata.

Para la exención de un estudio de BA relativa in vivo, la disolución debe ser superior al 85 % en 30 minutos en los 3 medios de disolución recomendados. Dos perfiles de disolución pueden considerarse similares cuando se comparan usando el factor de similitud (f_2 .50) como se describe en la guía para la industria sobre pruebas de disolución. En combinación con la disolución, la BCS tiene en cuenta los tres factores principales que rigen BA, a saber. disolución, solubilidad y permeabilidad.

Obtención de un biofármaco

Sistemas para la Producción de Biofarmacéuticos

A diferencia de las drogas sintéticas, los ingredientes farmacéuticos activos en los productos biofarmacéuticos incluyen proteínas recombinantes y ácidos nucleicos. Actualmente, la gran mayoría de los productos biofarmacéuticos disponibles en el mercado contienen proteínas recombinantes como ingrediente farmacéutico activo. Estas proteínas se producen en sistemas procariontes, principalmente *Escherichia coli*, o sistemas eucariotes basados en hongos (*Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*), células de mamíferos o líneas celulares de insectos. También se ha estudiado el uso de sistemas de expresión libres de células (sistemas in vitro), que facilitan mucho la modificación de las condiciones de síntesis (Martinez y otros, 2002).

La producción de productos biofarmacéuticos en cada uno de los sistemas antes mencionados tiene ventajas e inconvenientes. Por estas razones, se utilizan muchos sistemas de expresión diferentes en función de las propiedades específicas de una proteína recombinante dada.

1. Sistema de expresión de mamíferos

Los sistemas de expresión de mamíferos son generalmente la plataforma preferida para la fabricación de productos biofarmacéuticos. En los últimos años se ha observado un aumento constante en el uso de estos sistemas de expresión. Esto se debe al creciente interés en la producción de moléculas grandes y complejas que requieren modificaciones postraduccionales específicas (sobre todo la glicosilación) que ocurren solo en los sistemas de expresión de los mamíferos. Además, en el caso de líneas celulares de mamíferos y líneas celulares animales en general, la mayoría de las proteínas recombinantes pueden secretarse y no requieren lisis celular para extraerse con el posterior relegamiento de proteínas (como es el caso de las bacterias) (Butler & Dressman, 2010).

Sin embargo, la producción de proteínas en líneas celulares plantea posibles problemas de seguridad debido a la posibilidad de contaminación con virus animales. Otros inconvenientes de la producción de proteínas en líneas celulares incluyen los requisitos

nutricionales complejos, el crecimiento lento y la fragilidad, y un tiempo y costo de producción relativamente altos. Los sistemas de expresión de mamíferos actualmente disponibles incluyen células de ovario de hámster chino, líneas celulares de roedores (p. ej., NS0, BHK y Sp2/0) y líneas celulares humanas (p. ej., HEK293, PER.C6, HT-1080 y CAP). Entre las líneas celulares de mamíferos disponibles, la línea celular de ovario de hámster chino es la opción principal para la producción de proteínas recombinantes, con 7 de los 10 productos biofarmacéuticos más vendidos en 2016 producidos en estas células. En general, la cantidad de productos de proteínas recombinantes producidos en sistemas de mamíferos que están aprobados para su uso como medicamentos en humanos aumentó entre 2010 y 2014 a aproximadamente el 60 % (Kesik-Brodacka, 2017).

2. Sistema de expresión bacteriano

Sin embargo, las bacterias siguen siendo el sistema de expresión dominante, lo que facilita la producción de grandes cantidades de ingredientes farmacéuticos activos utilizados en productos biofarmacéuticos. Según los datos facilitados por BioProcess Technology Consultants, en 2010 la producción total de proteínas puras como principios activos farmacéuticos en biofármacos ascendió a 26,4 toneladas. De esto, el 68% se produjo en sistemas bacterianos y el 32% en sistemas de mamíferos. El grupo predominante de proteínas producidas en bacterias comprendía insulinas, y la gran mayoría de las producidas en sistemas de mamíferos eran anticuerpos monoclonales.

Las bacterias de elección para la expresión de proteínas heterólogas son *E. coli*. Su atractivo para aplicaciones industriales resulta de su genética bien entendida, biología celular y fácil manejo. Los sistemas de expresión basados en *E. coli* permiten un crecimiento rápido, un alto rendimiento del producto, una buena relación costo-beneficio, un escalado fácil del proceso y un tiempo de respuesta corto. Las limitaciones de este huésped de expresión para la producción de productos biofarmacéuticos recombinantes complejos incluyen la ausencia de modificaciones postraduccionales similares a las de los mamíferos, como glicosilación, fosforilación y procesamiento proteolítico. Por lo tanto, *E. coli* es el huésped de expresión elegido en la industria biotecnológica para la producción a gran

escala de pequeñas proteínas recombinantes que no requieren modificaciones postraduccionales. Otra limitación resulta de la incapacidad de *E. coli* para producir enlaces disulfuro correctos, problemas de solubilidad de las proteínas y la presencia de endotoxinas (lipopolisacáridos). Actualmente, se aplican varias estrategias para mejorar la expresión de proteínas, como el uso de cepas de *E. coli* mutadas para promover la formación de enlaces disulfuro de proteínas (Martinez y otros, 2002).

3. Sistema de expresión de levadura

Otros sistemas favorables de producción de proteínas recombinantes microbianas son los microorganismos eucariotas *S. cerevisiae* y *P. pastoris*. Ambos anfitriones son capaces de producir proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales y de plegamiento adecuadas. Por lo tanto, se consideran mejores que los procariotas donde se necesita la modificación postraduccional de la proteína diana. El sistema de expresión de la levadura *S. cerevisiae* se utiliza con frecuencia debido a su rápido crecimiento en medios libres de proteínas y su capacidad para secretar el producto de forma extracelular. Sin embargo, las modificaciones postraduccionales que ocurren dentro de las células a menudo conducen a la producción de hipermanosilación no deseada, que puede dar como resultado una actividad de unión a proteínas alterada y producir potencialmente una respuesta inmunogénica alterada en aplicaciones terapéuticas. En *P. pastoris*, los oligosacáridos tienen longitudes de cadena mucho más cortas y se ha informado que la cepa produce glicoproteínas complejas, terminalmente sialiladas o "humanizadas". *P. pastoris* es un sistema de expresión que es apreciado por su crecimiento a densidades celulares muy altas, por sus promotores fuertes y estrechamente regulados disponibles, y por la posibilidad de producir cantidades de gramos de proteínas recombinantes por litro de cultivo tanto intracelularmente como de forma secretora. Sin embargo, los rendimientos de proteína pueden ser notablemente más bajos, particularmente si las proteínas complejas expresadas son heterooligómeros, están unidas a la membrana o son propensas a la degradación proteolítica (Martinez y otros, 2002).

4. Sistema de expresión de líneas celulares de insectos

El sistema de producción de proteínas recombinantes basado en células de insectos representa un compromiso entre los sistemas de expresión de bacterias y mamíferos. Su ventaja sobre el sistema bacteriano es que permite modificaciones postraduccionales, pero, a diferencia del sistema de los mamíferos, no conserva el patrón de glicosilación original. Otra ventaja del uso de células de insectos es que son menos exigentes y crecen a densidades más altas en comparación con las células de mamíferos (Martinez y otros, 2002).

Se utilizó un sistema de expresión de líneas celulares de insectos para producir Cervarix, una vacuna contra ciertos tipos de virus del papiloma humano que causan cáncer. Esta vacuna fue aprobada por la EMA en 2007 (Martinez y otros, 2002).

5. Sistema de expresión vegetal

La producción de biofarmacéuticos derivados de plantas ha despertado un gran interés. Las plantas transgénicas tienen el potencial de convertirse en sistemas rentables para la producción a gran escala de proteínas terapéuticas humanas. El uso de plantas elimina la posible contaminación del fármaco terapéutico con patógenos animales, ya que los cultivos de células vegetales no son susceptibles a los patógenos virales de mamíferos y, por el contrario, los virus vegetales no infectan las células humanas. Otra ventaja es que las proteínas recombinantes inmunogénicas por vía oral expresadas en una planta comestible pueden administrarse por vía oral sin procesamiento, incluidos los costosos pasos de purificación. Además, los sistemas de expresión de las plantas pueden producir proteínas con patrones de glicosilación complejos; sin embargo, las estructuras de glicano producidas son significativamente diferentes de las producidas en humanos (Löbenberg & Amidon, 2000).

Los inconvenientes del sistema de expresión basado en plantas para la producción de proteínas recombinantes están relacionados con los largos plazos de producción que hacen que esta tecnología no sea adecuada para la producción rápida de productos farmacéuticos para combatir enfermedades emergentes. Otro problema es que los métodos

actuales en biotecnología de plantas no pueden controlar con precisión los niveles de expresión de transgenes en plantas de manera consistente (Löbenberg & Amidon, 2000).

6. Síntesis de proteínas libres de células

La síntesis de proteínas libres de células (CFPS), también denominada expresión in vitro, es una alternativa innovadora y prometedora a la expresión de proteínas recombinantes en células vivas. CFPS es la producción de proteínas recombinantes usando maquinaria de traducción extraída de células. En este sistema, las enzimas requeridas para los procesos de transcripción y traducción están presentes en un extracto celular en lugar de un organismo vivo. Varios obstáculos inicialmente limitaron CFPS como tecnología de producción de proteínas, incluidas las bajas tasas de producción de proteínas, los altos costos de los reactivos, las escalas de reacción pequeñas y la capacidad limitada para plegar correctamente las proteínas que contienen múltiples enlaces disulfuro (Löbenberg & Amidon, 2000).

Actualmente, debido al importante progreso realizado para automatizar y optimizar las condiciones de reacción, los sistemas sin células se han convertido en una atractiva plataforma de producción de proteínas que ofrece varias ventajas sobre los métodos tradicionales de expresión basados en células. En primer lugar, el entorno CFPS no está limitado por la presencia de una pared celular o condiciones de homeostasis para mantener la viabilidad celular. CFPS permite el acceso directo y, por lo tanto, el control del entorno de traducción y la manipulación de la composición y las condiciones de la reacción, lo que es ventajoso para la optimización de la producción de proteínas. Como resultado, se pueden agregar/sintetizar y mantener nuevos componentes en concentraciones precisas. Otras ventajas del CFPS sobre los sistemas basados en células incluyen la capacidad de producir proteínas difíciles de expresar, por ejemplo, proteínas de membrana y proteínas tóxicas. A diferencia de los sistemas basados en organismos vivos, se cree que las condiciones de síntesis de proteínas en CFPS son análogas a las de las reacciones químicas, lo cual es prometedor desde la perspectiva de la escalabilidad técnica (Löbenberg & Amidon, 2000).

Clasificación de los antibióticos

Los antibióticos antibacterianos se clasifican comúnmente según su mecanismo de acción, estructura química o espectro de actividad. La mayoría se dirigen a funciones bacterianas o procesos de crecimiento. Los que se dirigen a la pared celular bacteriana (penicilinas y cefalosporinas) o la membrana celular (polimixinas), o interfieren con las enzimas bacterianas esenciales (rifamicinas, lipiarmicinas, quinolonas y sulfonamidas) tienen actividad bactericida. Los que se dirigen a la síntesis de proteínas (macrólidos, lincosamidas y tetraciclinas) suelen ser bacteriostáticos (a excepción de los aminoglucósidos bactericidas) (O'Rourke y otros, 2020).

Clasificación de los antibióticos sobre la base de la estructura química:

Antibióticos que contienen carbohidratos:

Antibióticos sacáridos puros: ejemplos; estreptozotocina (Riu y otros, 2022)

Aminoglucósidos: ejemplos; Estreptomina (Riu y otros, 2022)

N/O glucósidos: ej. Cromomicina (Riu y otros, 2022)

Otro: por ejemplo; lincomicina (Riu y otros, 2022)

Antibióticos de lactona macrocíclica: p. Eritromicina (Riu y otros, 2022)

antibióticos quinolonas; p.ej. Fluroquinolona (Riu y otros, 2022)

Antibióticos heterocíclicos que contienen N: p. Beta-lactum (Riu y otros, 2022)

Antibióticos heterocíclicos que contienen O: p. cicloserina (Etebu & Ariekpar, 2016).

Antibióticos alicíclicos: ej. Cicloheximida (Etebu & Ariekpar, 2016).

Antibióticos aromáticos (nitrobenzeno): ej. Cloranfenicol (Etebu & Ariekpar, 2016).

Antibióticos de amina alifática: p. espermidina (Etebu & Ariekpar, 2016).

Antibióticos peptídicos: p. polimixina, bacitracina, gramicidina (Etebu & Ariekpar, 2016).

Clasificación de los antibióticos según su origen: Origen microbiano

Bacillus polymyxa: polimixina (Sandle T. , 2022)

Chromobacter violaceum: Bacitracina (Sandle T. , 2022)

Micromonospora spp: Gentamicina (Sandle T. , 2022)

Penicillium: penicilina (Sandle T. , 2022)

Cefalosporina spp: Cefalosporina (Sandle T. , 2022)

Streptomyces griseus: estreptomomicina (Sandle T. , 2022)

S. venezuelae: cloranfenicol (Sandle T. , 2022)

S. erythraeus: eritromicina (Sandle T. , 2022)

S. mediterraneus: Rifampicina (Sandle T. , 2022)

La categorización adicional se basa en la especificidad de su objetivo. Los antibióticos antibacterianos de "espectro reducido" se dirigen a tipos específicos de bacterias, como las bacterias gramnegativas o grampositivas, mientras que los antibióticos de amplio espectro afectan a una amplia gama de bacterias. Después de un paréntesis de 40 años en el descubrimiento de nuevas clases de compuestos antibacterianos, cuatro nuevas clases de antibióticos antibacterianos se han puesto en uso clínico: lipopéptidos cíclicos (como la daptomicina), gliciliclinas (como la tigeciclina), oxazolidinonas (como la linezolid) y lipiarmicinas. (como fidaxomicina) (Sandle T. , 2013).

Clasificación de los antibióticos sobre la base del rango de actividad (espectro de actividad):

Espectro estrecho:

Activo frente a relativamente menos microorganismos. Ejemplos: macrólidos, polimixina (Sandle T. , 2013).

Espectro moderado:

Activo frente a bacterias Gram positivas, así como algunas bacterias Gram negativas sistémicas y causantes de UTI. Ejemplos: Aminoglucósidos, Sulfonamida (Sandle T. , 2013).

Espectro estrecho-amplio:

Activo frente a Gram positivos y gram negativos. Ejemplos: Beta-lactum (Sandle T. , 2013).

Amplio espectro:

Activo contra Gram positivos y Gram negativos excepto *Pseudomonas* y *Mycobacteria*. Ejemplos: cloranfenicol, tetraciclina (Sandle T. , 2013).

Antibióticos antimicobacterianos:

Ejemplos: etambutol, rifampicina, isoniazida, pirazinamida (Sandle T. , 2013).

Capítulo III

Metodología

Ubicación 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

Ubicación geográfica

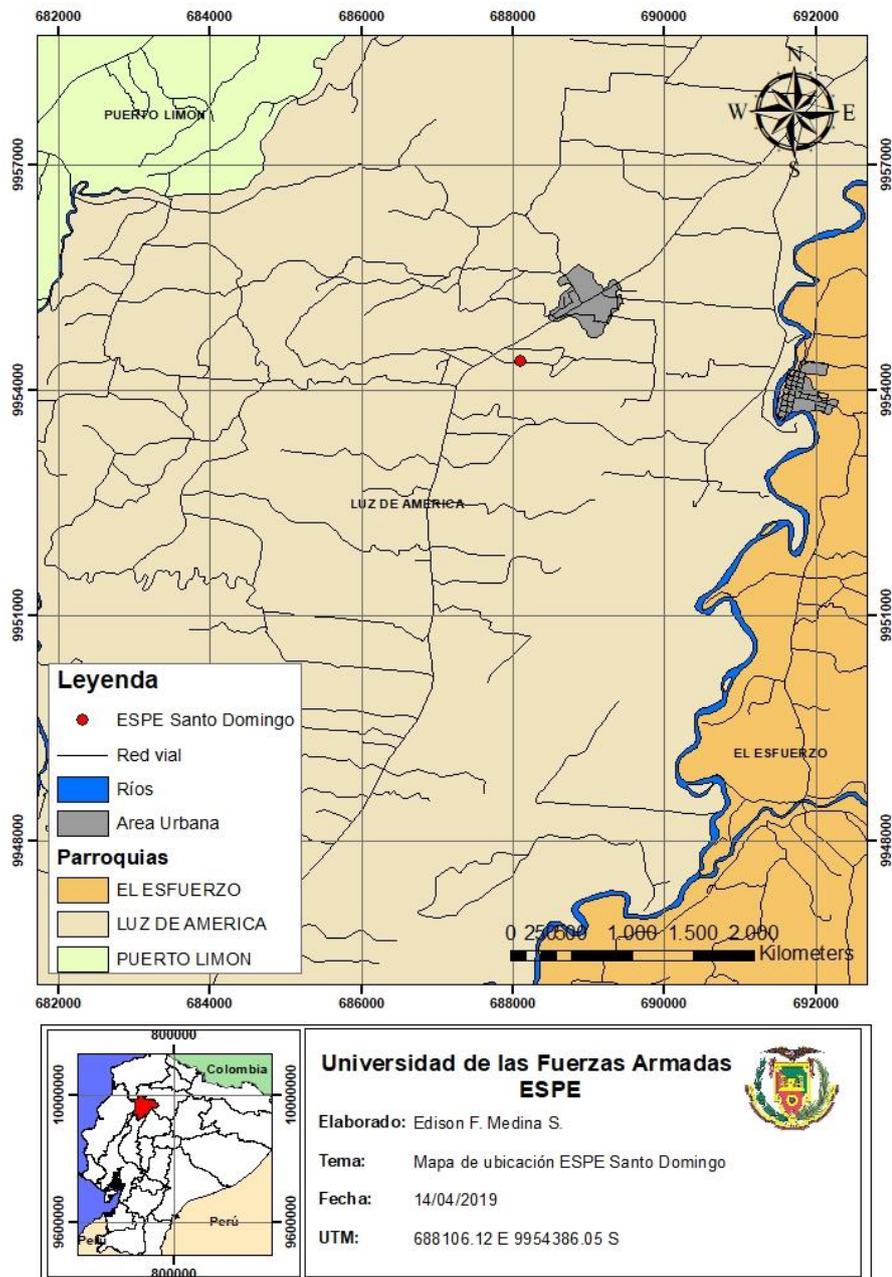
El presente trabajo de investigación se desarrolló en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, específicamente dentro de las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE-Sede Santo Domingo, en los laboratorios de Biotecnología Vegetal, Microbiología, Biotecnología Sanitaria, Biología Molecular y Laboratorio de Ciencias Químicas, ubicada en el km 24 de la Vía Santo Domingo-Quevedo.

Latitud: 0° 24' 20,74" S

Longitud: 79° 18' 2,23" W

Figura 1

Mapa de ubicación geográfica del área de investigación



Nota. Ubicación geográfica de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, sitio donde se realizó la parte práctica experimental de la investigación.

Materiales y métodos

Obtención del microorganismo

Se realizó una investigación bibliográfica determinando que el microorganismo *Penicillium Digitatum* crece en frutos cítricos, por lo tanto, se partió de ese conocimiento.

Protocolo:

Se colocaron 3 naranjas en distintas tarrinas lavadas y otras sin lavar en un ambiente con aire, mientras que otras 3 naranjas de igual forma se colocaron en un ambiente sin aire y se observó en el transcurso del tiempo en cuales crecía el microorganismo en menor tiempo.

Aislación y siembra del microorganismo (*Penicillium*)

Una vez obtenido el microorganismo se procedió a aislarlo del fruto en medios de cultivo (PDA)

Materiales:

Tabla 1

Materiales para la aislación y siembra del hongo Penicillium

Equipos	Insumos	Reactivos.
Autoclave	Haza de siembra	Papa dextrosa (PDA)
Cámara de flujo laminar	Matraz de 250ml	Agua destilada
Incubadora	Cajas Petri	
Plancha de calentamiento y agitación.	Algodón	
	Parafilm	
	Lámparas de alcohol	
	Agitador magnético	
	Alcohol al 70%	

Nota. Tabla de elaboración propia.

Protocolo:

Para la elaboración de la papa dextrosa (PDA) se procedió a pesar 9.75 g en papel aluminio, luego se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250ml y se aforo con la misma cantidad de agua destilada, se introdujo el agitador magnético y se colocó la solución en la plancha de calentamiento y agitación a una temperatura de 100 °C y 600 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos para activar el agar, luego de haber transcurrido el tiempo se procedió a sellar la boca del matraz con algodón y Parafilm.

Una vez activado el agar se lo colocó en la autoclave junto con las cajas Petri envueltas en papel Kraft a una temperatura de 120 °C y una presión de 15 libras entre 15 a 20 minutos.

Se procedió a desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol e hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% y se introdujo los materiales a utilizar como las lámparas de alcohol y el Parafilm cortado en un ancho de 1 centímetro. Se cerró la puerta de la cámara de flujo laminar y se procedió a encender la luz UV por un tiempo de 20 minutos.

Luego de haber transcurrido el tiempo del agar y de la desinfección de la cámara de flujo laminar, se apagó el UV y se introdujo en la misma las cajas Petri y el agar el cual se lo dejó enfriar a una temperatura de 45 a 60 °C para proceder a dispensar el medio en las cajas Petri para dejarlos gelificar e enfriar para proceder a realizar la siembra del *Penicillium Digitatum* mediante una haza de siembra, finalmente se selló la caja con Parafilm y se dejó incubar a una temperatura de 28 °C por 14 días.

Identificación del microorganismo

El microorganismo se identificó mediante dos tipos de tinciones y se comparó los resultados mediante información bibliográfica.

Tinción de azul de metileno**Materiales:****Tabla 2**

Equipos, insumos y reactivos utilizados en la identificación microscópica del microorganismo (hongo Penicillium) mediante azul de metileno.

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestras
Microscopio	Aceite de inmersión Portaobjetos Pipeta Pasteur Cinta adhesiva	Azul de metileno	Cepa de <i>Penicillium</i>

Nota. Tabla de elaboración propia.

Protocolo:

Se colocó una pequeña gota de azul de metileno en el portaobjeto; para la toma de muestra se cortó alrededor de 2 centímetros de cinta adhesiva transparente y se la pegó superficialmente encima del microorganismo que se encontraba en la caja Petri ya aislado y finalmente se pegó en el portaobjeto que continúa la gota de azul de metileno para proceder a observar en el microscopio su estructura.

Tinción de lactofenol**Materiales:****Tabla 3**

Equipos, insumos y reactivos utilizados en la identificación microscópica del microorganismo (hongo Penicillium) mediante azul de lactofenol.

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestras
Microscopio	Aceite de inmersión Portaobjetos Pipeta Pasteur	Azul de lactofenol	Cepa de <i>Penicillium</i>

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestras
	Cinta adhesiva		

Nota. Elaboración propia

Protocolo:

Se colocó una pequeña gota de lactofenol en el portaobjeto. Para la toma de muestra se cortó alrededor de 2 centímetros de cinta adhesiva transparente y se la pegó superficialmente encima del microorganismo que se encontraba en la caja Petri ya aislado y finalmente se pegó en el portaobjeto que continúa la gota de lactofenol para proceder a observar en el microscopio su estructura.

Fermentación

Para la elaboración del medio enriquecido mínimo se basó en un protocolo establecido por (Urbina Salazar, 2019)

Medio enriquecido mínimo (MEM)

Materiales:

Tabla 4

Equipos, insumos y reactivos para la elaboración del medio enriquecido mínimo (MEM).

Equipos	Insumos	Reactivos
Plancha de agitación	Agitador magnético	(Na ₂ HPO ₄)
Balanza analítica	Vasos de 1000 ml	((NaNO ₂)
	Espátula	(NaSO ₄)
	Vidrio reloj	(KH ₂ PO ₄)
		(MgSO ₄ *7H ₂ O)
		(MnCl ₂ *4H ₂ O)
		(ZnCl ₂)
		(CaCl ₂ *2H ₂ O)
	(FeCl ₃ *6H ₂ O)	
	(CoCl ₂ *2H ₂ O)	

Nota. Elaboración propia.

Protocolo:

El medio mínimo enriquecido (Mme) contiene los siguientes componentes: 18.86 g L-2.3 Na₂HPO₄, 0.69 g L-2.3NaNO₂, 4.6 g L-2.3 NaSO₄, 8.74 g L-2.3 KH₂PO₄, 0.012 g L-2.3 MgSO₄*7H₂O, 0.23 g L-2.3 MnCl₂*4H₂O, 0.39 g L-2.3 ZnCl₂, 1.27 g L-2.3 CaCl₂*2H₂O, 3.84 g L-2.3FeCl₃*6H₂O, 0.14 g L-2.3 CoCl₂*2H₂O. Se mezcló bien mediante la plancha de agitación hasta diluir todos los compuestos.

Preparación de medios

Materiales:

Tabla 5

Equipos, insumos, reactivos y muestras para la preparación de los diferentes medios.

Equipos	Insumos	Reactivos
Autoclave	Probeta de 250 ml	PDA Agar
Cámara de flujo laminar	Matraces Erlenmeyer de 250 ml	Harina de maíz
	Algodón	MEM
	Gasas	

Nota. Elaboración propia.

Protocolo:

En los matraces 02 y 05 se colocó 3 g de dextrosa de papa (PDA), mientras que en los 03 y 06 se colocó 7.5 g de harina de maíz; mientras que en los matraces 01 y 04 no se les agregó nada. Luego se realizó con algodón y gasas los tapones de los 14 matraces.

Una vez pesados los compuestos en los matraces se procedió a colocar 150 ml del medio mínimo enriquecido en cada matraz obteniendo un total de 14 matraces ya que se hizo por triplicado el medio del agar (02 y 05) y del maíz (03 y 06).

Los matraces que contenían agar se procedieron a activarlo mediante la plancha de calentamiento y agitación a una temperatura de 80 °C por 5 minutos y finalmente se procedió a medir el pH de la solución y ajustarlo entre 4.5 y 5.0.

Los matraces que contenían la harina maíz se los agitó en la plancha de agitación para disolver completamente la misma, de igual forma se midió el pH de la solución y se ajustó entre 4.5 y 5.0.

El medio de cultivo (Mc) ajustado el pH se tapó con los tapones de algodón y se los cubrió con papel aluminio por encima, esto se autoclavó a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 libras por 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se dejó enfriar los medios de cultivo.

Preparación del buffer para siembra

Materiales:

Tabla 6

*Equipos, insumos y reactivos para la preparación del buffer para la siembra de hongo *Penicillium*.*

Equipos	Insumos	Reactivos
Autoclave	Vaso de precipitación de 250 ml	Agua destilada
Plancha de agitación	Agitador magnético	Cloruro de magnesio (MnCl ₂) 0.1M

Nota. Elaboración propia.

Protocolo:

Para la elaboración del buffer se autoclavó 200 ml agua destilada para esterilizarla a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 libras por 20 minutos. Luego de haber transcurrido ese tiempo se dejó enfriar el agua y se agregó 1.91 g MnCl₂ y se agitó en la plancha de agitación hasta disolver todo el cloruro de magnesio.

Siembra del microorganismo *Penicillium*

Materiales:

Tabla 7

Equipos, insumos, reactivos, y muestras para la siembra del hongo Penicillium.

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestras
Cámara de flujo laminar	Puntas	Hipoclorito de sodio al 10%	Cepa de <i>Penicillium</i>
Autoclave	Lámparas alcohol.	de Buffer	
Micropipeta de 100 - 1000 ul	Vasos de precipitación de 600 ml	de Etanol al 70%	
	Haza triangular		
	Probeta de 10 ml		

Nota. Tabla de elaboración propia.

Protocolo:

Se autoclave los materiales a usar mediante la siembra como: puntas, vasos de precipitación de 600 ml, 200 ml de agua destilada, haza triangular de metal y la probeta de 10ml a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 libras por 20 minutos; mientras tanto se limpió la base y las paredes de la cámara de flujo laminar con hipoclorito de sodio y luego con etanol al 70%, se introdujo los materiales que se autoclave dentro de la cámara de flujo laminar, se cerró la puerta y se prendió la luz UV para esterilizar el ambiente interno de la cámara y los materiales por 20 minutos. Luego de haber transcurrido ese tiempo se procedió a introducir el microorganismo cultivado en PDA sólido por 14 días en cajas Petri.

Se colocó buffer de Cloruro de magnesio (MnCl₂) al 0.1M en 8 cajas que contenían el microorganismo *Penicillium Digitatum* y con el haz triangular se removió la mayor parte del microorganismo y se colocó todo en un mismo vaso de precipitación. Luego se midieron

volúmenes de 7.5 ml de la muestra se colocó en todos los matraces que contenían el medio enriquecido y en los matraces que contenían el agar y el maíz.

Incubación de los medios de cultivos

Materiales:

Tabla 8

Equipos para la incubación de los medios de cultivo

Equipos
Agitador orbital
Incubadora

Nota. Tabla de elaboración propia.

Protocolo:

Se elaboraron dos condiciones para las muestras y se dividieron de la siguiente forma; sin agitación los matraces 01, 02 y 03 los cuales se incubaron a una temperatura de 28 °C por 14 días y los de agitación que eran los matraces 04, 05, y 06 que se colocaron en un agitador orbital el cual se introdujo en la incubadora y se dejó incubar a una temperatura de 28 °C por 14 días.

Toma de muestras de los medios de cultivos fermentados

Materiales:

Tabla 9

Equipos, insumos, y muestras para la toma de muestras de los medios de cultivos fermentados.

Equipos	Insumos	Muestra
Cámara de flujo laminar	Puntas	Medios de fermentación
Micropipeta de 100 a 1000 ul	Vaso de precipitación	
	Lámparas de alcohol	
	Tubos de ensayo con rosca	

Equipos	Insumos	Muestra
	Alcohol al 70%	

Nota. Tabla de elaboración propia.

Protocolo:

Se desinfectó la cámara de flujo laminar con hipoclorito de sodio al 1% y alcohol al 70%, luego se introdujeron los materiales a usar y se encendió la luz UV por 20 minutos para desinfectarlos. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a encender las lámparas de alcohol e introducir los 14 matraces que contenían el medio fermentado y se agarró de cada uno de ellos 5 ml de muestras con la ayuda de la micropipeta y se colocó en los tubos de ensayo con rosca. Se tomo muestras de los días 0, 5, 7, 11, y 14.

Determinación de la biomasa producida

Materiales:

Tabla 10

Equipos y muestras para la determinación de la biomasa

Equipos	Muestra
Centrífuga	Medios de fermentación
Espectrofotómetro	

Nota. Tabla de elaboración propia.

Se centrifugo 10 ml de cada medio de fermentación por triplicado de los diferentes días en los que se tomó las muestras (día 0, 5, 7, 11 y 14) y se midió la absorbancia mediante espectrofotometría a 540 nm.

Determinación de la cuantificación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas en medios líquidos de los diferentes días por el método de Biuret en concentraciones de (1 a 10 mg) utilizando el protocolo establecido por (Inca Torres, 2019).

Método de Biuret

Tabla 11

Equipos, insumos, reactivos, y muestras para la cuantificación de proteínas por el método de Biuret

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestra
Plancha de agitación	Agitador magnético	Sulfato de cobre (II) pentahidratado	Medios de fermentación
Espectrofotómetro	Probeta de 100 ml	Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado. Yoduro de potasio Hidróxido de sodio Solución estándar de BSA en concentraciones de 1 mg/mL hasta 10 mg/mL Agua destilada.	

Nota. Tabla de elaboración propia.

Protocolo:

En el frasco ámbar de 1000 mL se agregaron 0.75 g de sulfato de cobre (II) pentahidratado y 100 mL de agua destilada, se introdujo el agitador magnético y en la plancha de agitación se agito hasta disolver el compuesto, luego se añadió 100 mL de agua destilada y se colocó ahí mismo 3 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado de igual forma se agito hasta disolver el compuesto y obtener una mezcla homogénea. Añadir 150 mL 10% (p/v) de NaOH y agregar agua destilada hasta llegar a un volumen de 500 ml. Agregar 1 g de yoduro de potasio para evitar la reducción del cobre. Cubrir con aluminio el frasco y conservar en un lugar oscuro y fresco.

La cuantificación de proteína según lo establece el método se agrega 0.5 mL de la muestra en 2.5 mL del reactivo Biuret, se agita mezclando las dos soluciones y se deja

incubar a temperatura ambiente (25 °C) por 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se lee la absorbancia a 540 nm. La cuantificación de proteínas tanto para la curva patrón de BSA como la medición de las muestras de los medios de fermentación se realizó por triplicado.

La concentración de proteínas se determina mediante interpolación sobre una curva patrón realizada con albumina bovina entre un rango de 1 a 10 mg/mL (Figura 1)

Tabla 12

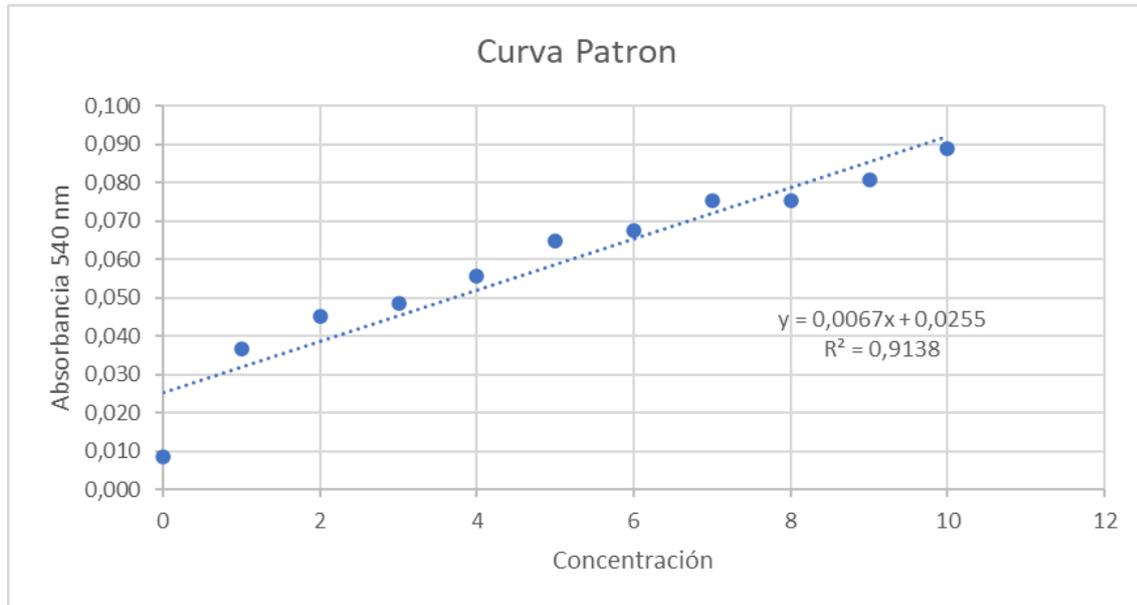
Valores de la curva patrón de calibración

Tubo	Concentración BSA (mg/mL)	Absorbancia 540 nm
0	0	0.0090
1	1	0.0368
2	2	0.0452
3	3	0.0485
4	4	0.0556
5	5	0.0647
6	6	0.0675
7	7	0.0754
8	8	0.0754
9	9	0.0809
10	10	0.0888

Nota. Tabla de elaboración propia.

Figura 2

Curva patrón de calibración de la concentración de 1 a 10 mg/ml de BSA.



Nota. Tabla de elaboración propia.

La concentración de proteína se calculó mediante la ecuación de la recta.

$$y = 0.0067X + 0.0255$$

Se despeja X y se obtuvo la siguiente fórmula:

$$X = \frac{Y - 0.0255}{0.0067}$$

Donde:

Y = Absorbancia de las muestras.

Se reemplazó los valores de la absorbancia en la fórmula y se obtuvo el total de proteínas de cada muestra (mg/ml) la cual se realizó por triplicado.

Determinación de la actividad Proteolítica

La actividad proteolítica se determinó mediante el método de determinación de la actividad proteolítica de (Gomez y otros, 2012)

Materiales:**Tabla 13**

Equipos, insumos, reactivos, y muestras para la determinación de la actividad proteolítica.

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestra
Plancha de agitación	Agitador magnético	Caseína	Medios de fermentación
Espectrofotómetro	Frasco ámbar con rosca de 1000 ml	Fosfato mono-potásico (KH ₂ PO ₄)	
Centrífuga.	Probeta de 100 ml	Fosfato di-sodio (NaHPO ₄)	

Nota. Tabla de elaboración propia.

Protocolo:

Se preparo la solución tampón fosfato preparando las siguientes soluciones.

Solución de fosfato mono-potásico: se pesó 7.56 g KH₂PO₄ y se diluyo en un litro de agua destilada.

Solución de fosfato de di-sodio: se pesó 9.56 g de NaHPO₄ y se diluyo en un litro de agua destilada.

Preparación del buffer de fosfato 50 mM

Se coloco en un vaso de precipitación 196 ml de la solución de KH₂PO₄ y 804 ml de NaHPO₄ obteniendo un volumen de un litro, luego en otro vaso se procede a colocar 900,9 ml de la solución preparada anteriormente y se afora hasta llegar al litro obteniendo el buffer de fosfato 50 mM a pH 7.5 luego a este mismo buffer se le añade 10 g de caseína para obtener una solución de caseína al 1% preparada en tampón fosfato de sodio 50 mM/L a pH 7.5.

Para la preparación de la muestra se colocó en 6 tubos de ensayo por triplicado de cada uno 1.1 ml de solución de caseína al 1% en tampón fosfato de sodio 50 mM/L a pH 7.5 y 0.1 ml de muestra centrifugada de cada uno de los medios de fermentación (6 muestras). Se dejo incubar en el baño maría por 20 minutos a una temperatura de 37°C, una vez

transcurrido ese tiempo se colocó en los 18 tubos 1.8 ml de ácido tricloroacético (TCL) al 5% y se centrifugo a 3500 rpm por 30 minutos y finalmente se determinó el DO a 540 nanómetros del sobrenadante.

Purificación

Filtración

Materiales:

Tabla 14

Insumos y muestras para el proceso purificación mediante filtración

Insumos	Muestra
Embudo	Medios de fermentación
Papel filtro de celulosa.	
Soporte universal	
Soporte de embudos	

Nota. Tabla de elaboración propia.

Protocolo:

Se armo un soporte universal donde se colocó el soporte para embudos colocando los mismo dentro, luego se colocó en los embudos el papel filtro de celulosa en forma de cono y se filtró las diferentes muestras de fermentación (MEM, MEM + Agar, y MEM + Maíz) con y sin agitación.

Precipitación y filtración**Materiales:****Tabla 15***Equipos, insumos y muestras para la purificación mediante precipitación y filtración*

Equipos.	Insumos	Muestra
Centrífuga	Tubos de ensayo de plástico Gradilla Filtro de celulosa Embudos Soporte universal Soporte de embudos	Medios de cultivo fermentado filtrado

Nota. Tabla de elaboración propia.

Protocolo:

Se colocó en tubos de ensayo los diferentes medios fermentados filtrados y se los centrifugó a 3500 rpm por 20 minutos y se filtró nuevamente con papel filtro de celulosa separando en recipientes diferentes el sobrenadante del precipitado unificando las muestras que se habían realizado por triplicado.

Sulfato de amonio**Materiales****Tabla 16***Equipos, insumos, reactivos, y muestras para la purificación mediante sulfato de amonio y precipitación*

Equipos.	Insumos	Reactivos	Muestra
Centrífuga	Tubos de ensayo de plástico	Sulfato de amonio	Medios de cultivos fermentados

Equipos.	Insumos	Reactivos	Muestra
			precipitados y filtrados.
	Gradilla		

Nota. Tabla de elaboración propia.

Protocolo:

Se midió el volumen final obtenido del sobrenadante y se colocó 10 g de sulfato de amonio por cada 100 ml de solución obtenida, se mesclo bien hasta diluir el sulfato de amonio y se centrifugo a 3500 rpm por 20 minutos. De igual forma se separó el sobrenadante del precipitado y se pesó en una balanza analítica el total obtenido de precipitado.

Cromatografía de capa fina (CCF)

Materiales:

Tabla 17

Equipos, insumos, reactivos, y muestras para cromatografía de capa fina (CCF)

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestra
Placas CCF de sílice	Capilares	Tolueno	Penicilina comercial
Campana de absorción de gases.	Pipeta de 5 ml	Acetato de etilo	Biofármaco purificado
Balanza analítica.	Pera	Ácido acético	
	Vaso de precipitación 1L	Iodo metálico 268nm (indicador)	
	Vidrio reloj	Metanol	
	Espátula		

Nota. Tabla de elaboración propia.

Protocolo:

Se utilizó un protocolo establecido por (Lozada Tonato, 2018) donde se disolvió 25 mg de la penicilina comercial en 5 ml de metanol. Para la fase móvil se preparó una solución con relación 4:4:2 de tolueno, acetato de etilo y ácido acético en un vaso de precipitación de 1L donde se mesclo bien los tres compuestos y se tapó con un vidrio reloj para que no se disiparan los gases fuera de la cámara de revelación (vaso de precipitación).

Se colocó en la placa CCF de sílice con un capilares la muestra preparada de penicilina comercial y separada por más o menos un centímetro se colocó las soluciones del biofármacos del día 7 y 11 obtenidos de la fermentación del medio de cultivo mínimo enriquecido del agar y maíz, dejó secar y se llevó a la cámara de revelación la cual contenía la fase móvil y se dejó correr las muestras durante cierto tiempo hasta el punto que no mostro movimiento en la placa de CCF y se revelo con vapor o gas de yodo metálico en la campana de absorción de gases.

Se midió la distancia recorrida de cada una de las muestras mediante el “cálculo del factor de retención Rf”

Antibiograma**Materiales:****Tabla 18**

Equipos, insumos, reactivos, y muestras para la elaboración del antibiograma

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestra
Cámara de flujo laminar	Matraz Erlenmeyer de 500 ml	MRS Agar	Antibiótico obtenido de la fermentación
Autoclave	Tubos de ensayo	Discos de penicilina comercial	
Plancha de agitación y calentamiento	Cajas Petri	Hipoclorito de sodio al 10%	

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestra
Micropipeta de 0.1 a 20 ul	Asa triangular microbiológica Papel filtro Vidrios reloj	Alcohol al 70%	

Nota. Tabla de elaboración propia.

Protocolo:

Para la preparación del medio se pesó 20.5 g de agar MRS y se los diluyo en 300 ml de agua destilada que se encontraban medidos en un Matraz Erlenmeyer de 500 ml, el cual se colocó en una plancha de agitación y calentamiento a una temperatura de 60 °C por 15 minutos, luego se tapó el matraz con algodón y se lo introdujo en la autoclave junto con las cajas Petri envueltas en papel Kraft a utilizar y se autoclavó por 15 minutos a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 libras.

Se limpio la cámara de flujo laminar con hipoclorito de sodio al 10% y luego con alcohol al 70% y finalmente se prendió la UV por 15 minutos, descontaminando la cámara de flujo laminar para su posterior uso. Luego de haber transcurrido el tiempo se introdujo el material estéril a la cámara y se dispenseo 20 ml de agar MRS por caja obteniendo un total de 15 cajas Petri se dejó enfriar y se preparó una dilución seriada a la menos 3 en agua de peptona de la bacteria *Lactococcus lactis* obtenida del laboratorio de bromatología de la ESPE sede Santo domingo. Una vez frio el agar se procedió a colocar 1ml de la dilución a la menos 3 de la bacteria en cada caja y finalmente se colocó el disco control de penicilina comercial en una caja y en las otras cajas se colocó 2 discos de papel filtros embebidos en 1 ml de la solución obtenida del medio fermentado del día 7, otro del día 11, un disco de la fermentación con la solución madre y un blanco de agua, esto se incubo por 5 días a una temperatura de 38 °C para verificar la eficiencia del antibiótico. Obteniendo un total de 5 muestras por caja y un triplicado de cada una de ellas.

Microencapsulación con alginato

Tabla 19

Insumos, reactivos, y muestras para la encapsulación mediante emulsión iónica

Insumos	Reactivos	Muestra
Vasos de precipitación de 250 ml	Alginato al 2%	Biofármaco
Vasos de precipitación de 600 ml	Cloruro de calcio al 10%	
Micropipeta de 100 – 1000 ul		
Puntas		

Nota. Tabla de elaboración propia.

Protocolo:

Se preparo la solución de cloruro de calcio al 10% colocando 10 g de cloruro de calcio en 100 ml de agua destilada y se colocó 2g de alginato en 100 ml de solución del biofármaco obteniendo una solución al 2%, se agito la solución hasta que tome una textura viscosa o gelatinosa y se tomó 1000 ul con de la solución del biofármaco con las puntas cortadas de las puntas de la micropipeta y se colocó en la solución de cloruro de calcio al 10% formando capsulas del biofármaco (Pasin y otros, 2012).

Diseño experimental

Factores y niveles de estudio

Tabla 20

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

Nota. Se especifican los tipos de medio de cultivo, tipo de oxigenación y los días de medición aplicados en la investigación.

Tratamientos a comparar

Tabla 21

Tratamientos a analizar en el proceso de obtención del biofármaco.

N°	Tratamientos	Combinación
1	a0b0c0	MEM + Sin agitación + 0
2	a0b0c1	MEM + Sin agitación + 5
3	a0b0c2	MEM + Sin agitación + 7
4	a0b0c3	MEM + Sin agitación + 11
5	a0b0c4	MEM + Sin agitación + 14
6	a0b1c0	MEM + Con agitación + 0

N°	Tratamientos	Combinación
7	a0b1c1	MEM + Con agitación + 5
8	a0b1c2	MEM + Con agitación + 7
9	a0b1c3	MEM + Con agitación + 11
10	a0b1c4	MEM + Con agitación + 14
11	a1b0c0	MEM + Agar + Sin agitación + 0
12	a1b0c1	MEM + Agar + Sin agitación + 5
13	a1b0c2	MEM + Agar + Sin agitación + 7
14	a1b0c3	MEM + Agar + Sin agitación + 11
15	a1b0c4	MEM + Agar + Sin agitación + 14
16	a1b1c0	MEM + Agar + Con agitación + 0
17	a1b1c1	MEM + Agar + Con agitación + 5
18	a1b1c2	MEM + Agar + Con agitación + 7
19	a1b1c3	MEM + Agar + Con agitación + 11
20	a1b1c4	MEM + Agar + Con agitación + 14
21	a2b0c0	MEM + Maíz + Sin agitación + 0
22	a2b0c1	MEM + Maíz + Sin agitación + 5
23	a2b0c2	MEM + Maíz + Sin agitación + 7
24	a2b0c3	MEM + Maíz + Sin agitación + 11
25	a2b0c4	MEM + Maíz + Sin agitación + 14
26	a2b1c0	MEM + Maíz + Con agitación + 0
27	a2b1c1	MEM + Maíz + Con agitación + 5
28	a2b1c2	MEM + Maíz + Con agitación + 7
29	a2b1c3	MEM + Maíz + Con agitación + 11
30	a2b1c4	MEM + Maíz + Con agitación + 14

Nota. Interacciones formadas en el diseño experimental.

Tipo de diseño

Se aplicó un ANOVA con arreglo factorial $A \times B \times C$ ($3 \times 2 \times 5$), donde el factor A corresponde a los tipos de medio de cultivo, el factor B hace referencia a las condiciones de fermentación (con agitación y sin agitación), mientras que el factor C son los días de medición, con un total de 30 tratamientos.

El diseño experimental se realizó con 3 repeticiones por tratamiento, dando un total de 90 unidades experimentales.

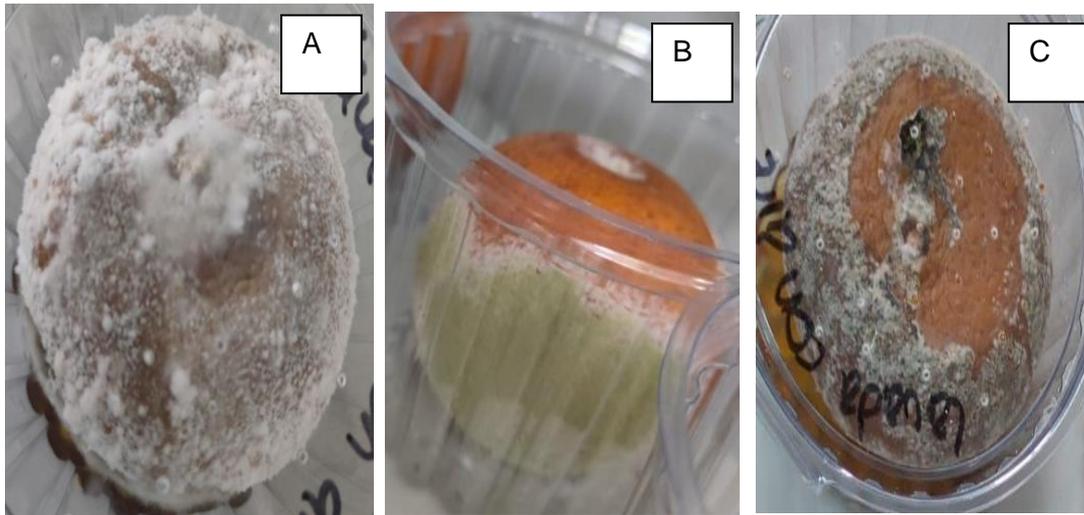
Capítulo IV

Resultados

Obtención del microorganismo

Figura 3

Desarrollo macroscópico de las colonias del hongo Penicillium



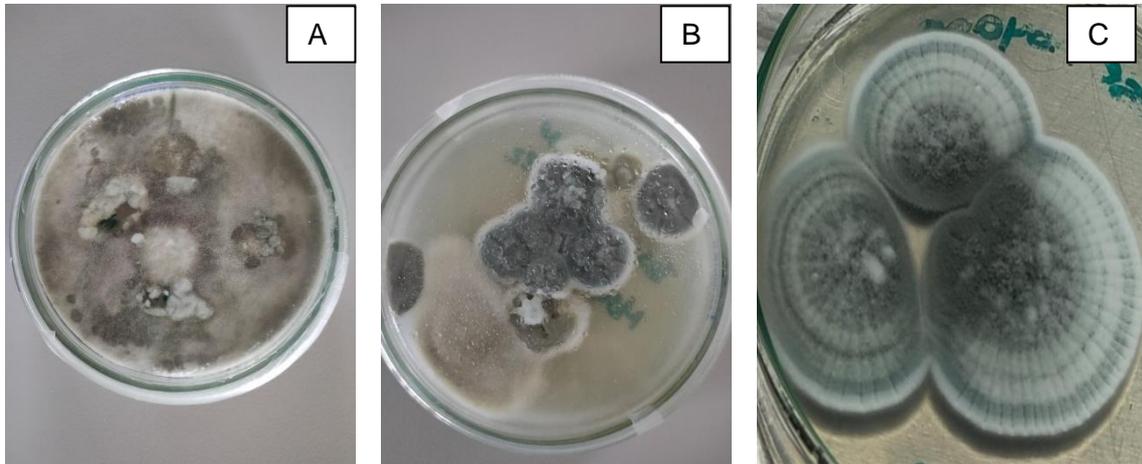
Nota. Etapas del hongo en la fruta y su desarrollo

Tras la investigación bibliográfica se determinó que el género *Penicillium* crece en frutas cítricas por lo que se elaboró dos condiciones (con aireación y sin aireación) en las cuales se determinó que este hongo se desarrolla en condiciones aeróbicas y sin lavar más rápido en un lapso de 15 días, aunque su crecimiento comienza a notarse a los 5 días formando un moho blanco sobre la fruta (Figura 3 A) y en el transcurso del tiempo entre el día 8 hasta el 15 comienza su desarrollo tornándose color verde claro (Figura 3 B), luego pasa a tener un azul turquesa fuerte y finalmente se torna grisáceo verdoso alcanzando su etapa máxima de desarrollo (Figura 3 C). Mientras que en las naranjas lavadas o sin aireación se demoró en crecer el hongo ya que se comenzó a presentar la presencia de moho alrededor del día 20.

Aislación y siembra del microorganismo (*Penicillium*)

Figura 4

Desarrollo de la obtención de la cepa pura del hongo Penicillium



Nota. Desarrollo morfológico del microorganismo *Penicillium*.

Una vez obtenido el microorganismo se aisló en la caja Petri, obteniendo al inicio una caja con diferentes especies de hongos, tras identificar el hongo por su morfología e identificar que era el que más crecía en abundancia (Figura 4 A, B) se aisló obteniendo una cepa más pura donde se puede observar detalles de forma macroscópica ya que posee una superficie blanca y vellosa que con el tiempo solo cubre sus bordes, de igual forma comienza a crecer con un moho blanco el cual se tornó color verde, luego un azul verdoso y finalmente un gris claro, en la forma se pudo evidenciar unas especies de líneas formando un tipo de líneas radiales que salen del centro hacia el extremo del hongo (Figura 4 C).

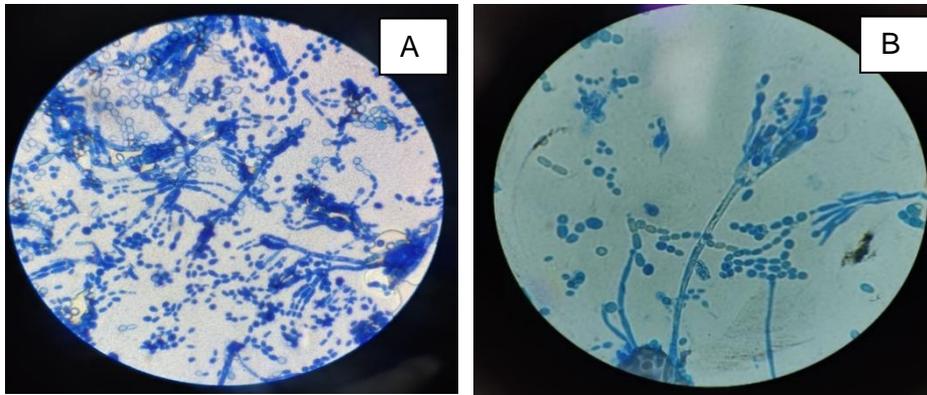
Identificación del microorganismo

Se identificó la morfología y estructura a nivel microscópico del microorganismo con dos diferentes tinciones:

Tinción de azul de metileno

Figura 5

Identificación microscópica del hongo *Penicillium* por azul de metileno

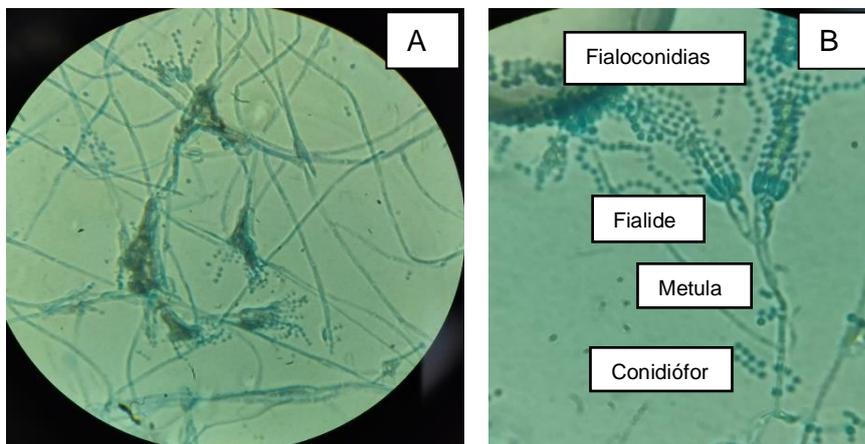


Nota. Estructura microscópica del hongo *Penicillium*

Tinción de azul de lactofenol

Figura 6

Identificación microscópica del hongo *Penicillium* por lactofenol



Mediante la tinción de azul de metileno y lactofenol se observó la estructura microscópica de la colonia del hongo del género *Penicillium* con un aumento de 40X (Figura 5 A), mientras que con el aumento de 100X (Figura 5 B) se evidenció su estructura más detallada observándose un conjunto de hifas que se encuentran alrededor del talo constituyendo el cuerpo del hongo, además de poseer conidoforos hialino localizados en los extremos de las hifas o a su vez se presentan sueltos alrededor; las hifas se presentaron de forma ramificada y septadas y al final de estas se forman métulas en las cuales se

presentan entre 4 y 5 fiáldades de las cuales de igual forma nacen cadenas de conidios de forma redonda denominados fialoconidias.

Al comparar las dos tinciones se observó que la tinción de azul de metileno (Figura 5 A, B) coloreaba más las estructuras dando un azul intenso, pero opacaba un poco algunas formas, mientras que el azul de lactofenol (Figura 5 A, B) al teñir su estructura de un azul opaco permitía observar de forma más detallada ya que no se presentaba tinciones fuertes entre las ramificaciones del *Penicillium*.

Medios de cultivo (liquido)

Figura 7

Identificación morfológica del crecimiento del hongo Penicilum en caldo

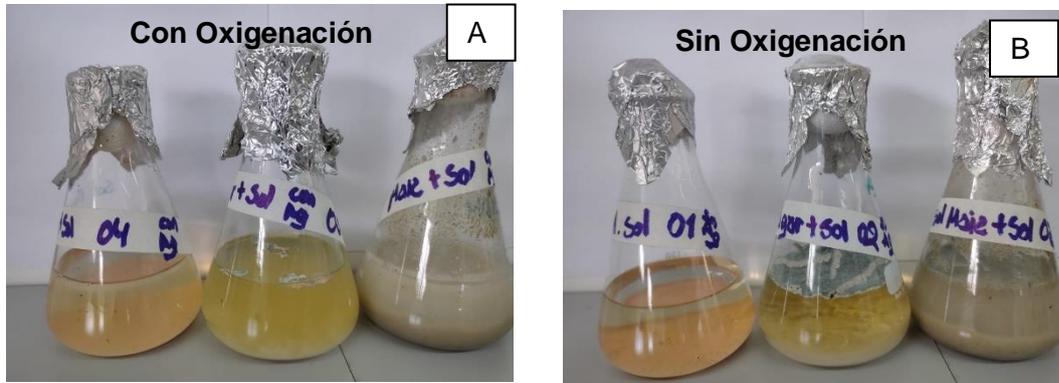


Nota. Crecimiento del hongo en el medio acuoso.

En la Figura 7, se observó que el hongo *Penicillium* en un medio líquido crea una especie de capa babosa a la que se adhiere para desarrollarse formando una capa menos densa que el medio permitiéndole flotar, también se observó que donde inicio su crecimiento la parte que está en contacto con el agar se tornó de color amarillo rojizo y una vez que comienza su crecimiento exponencial crece con coloración normal formando un moho blanco a sus alrededores y tomando sus colores como se explicó en la obtención y aislación del microorganismo.

Figura 8

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



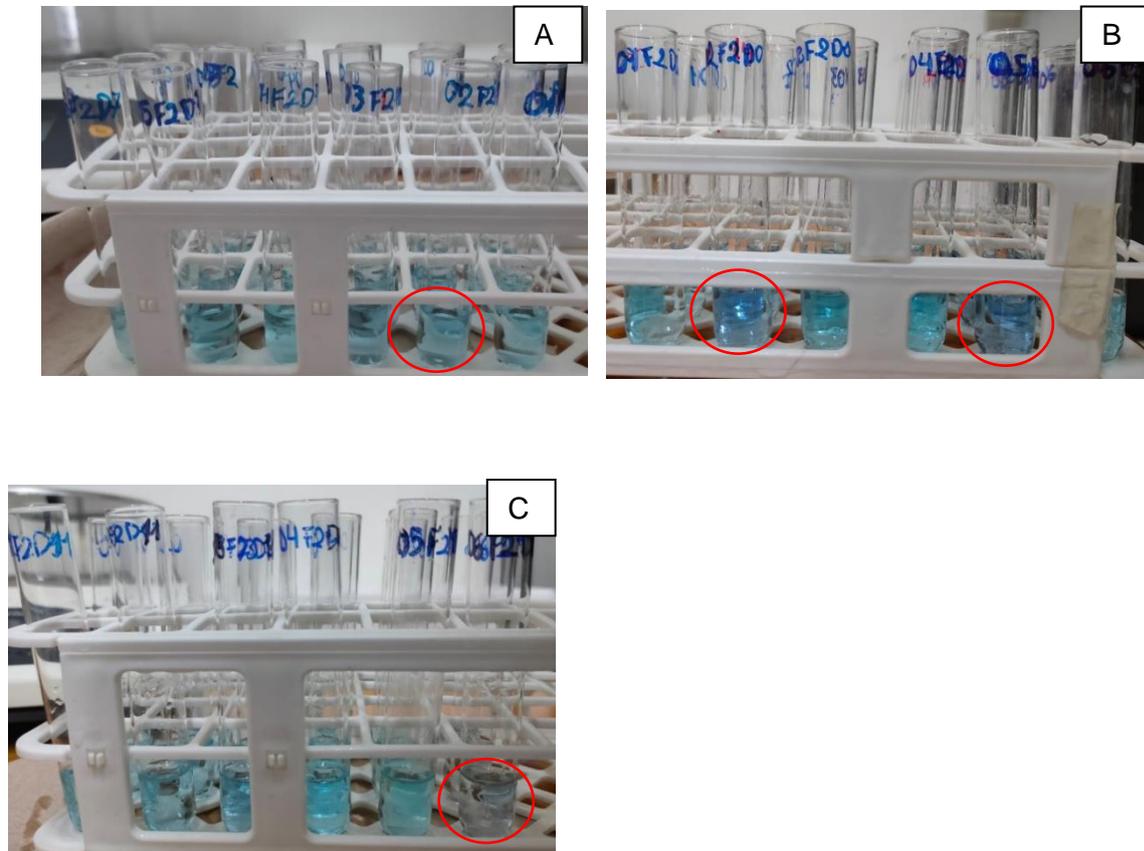
Nota. Crecimiento del hongo 3 tipos de medios con dos condiciones diferentes.

Al comparar los tres tipos de medios en las dos condiciones que se presentó se observó que al día 5 el hongo *Penicillium* crecía formando un micelio baboso color blanco por arriba y por abajo presento un color amarillo rojizo (Figura 7), además se desarrolló mejor en condiciones sin oxígeno (Figura 8 B) ya que había mayor proporción de microorganismo en el medio cubriendo toda la superficie del medio, mientras que en la condición con oxigenación (Figura 8 A) se presentó en pequeñas cantidades casi nulas, sin embargo, con el transcurso de los días el hongo fue creciendo. Hay que recalcar que en el medio de cultivo mínimo enriquecido no hubo presencia de hongo, esto se debe a que no posee una fuente de carbohidratos o azúcares que le permitan su desarrollo como en los otros dos medios que contenían agar y maíz.

Medición de proteínas mediante el método de Biuret

Figura 9

Toma de datos mediante el método de Biuret para proteínas totales



Nota. Cambio de coloración mediante la reacción de Biuret con proteínas.

Mediante el desarrollo del método de Biuret se observó que dependiendo al día de la toma de muestra y el medio cultivo (MEM, MEM+AGAR, MEM+ MAIZ) en las diferentes condiciones (Con oxigenación y sin oxigenación) existía cambio de coloración en ciertas soluciones tornándose algunas celestes claras (Figura 9 A), otro azul (Figura 9 B) y azul pálido o transparente (Figura 9 C).

Análisis de varianza

Tabla 20

Análisis de Varianza para Biomasa (Absorbancia)

<i>FV</i>	<i>SM</i>	<i>GI</i>	<i>CM</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Medios de cultivo	0,0604481	2	0,030224	62,11	0,0000
B: Tipo de oxigenación	0,000712167	1	0,000712167	1,46	0,2313
C: Días de medición	0,0338324	4	0,0084581	17,38	0,0000
D: Replicas	0,0000518287	2	0,0000259143	0,05	0,9482
INTERACCIONES					
AB	0,00174395	2	0,000871977	1,79	0,1757
AC	0,0128636	8	0,00160795	3,30	0,0036
BC	0,0141592	4	0,00353981	7,27	0,0001
ABC	0,0113487	8	0,00141859	2,92	0,0084
RESIDUOS	0,0282234	58	0,000486611		
TOTAL (CORREGIDO)	0,163383	89			

Nota. Considerar el valor $p \leq 0.05$.

Mediante la tabla 20 del análisis de varianza de biomasa considerando el valor de P y la significancia $p \leq 0.05$, se determinó que el medio de cultivo y los días de medición influye en la determinación de la cantidad de biomasa obtenida, ya que, se observa diferencia significativa de los factores en estudio (Factor A y C), mientras que en el tipo de oxigenación y las réplicas no existe diferencia significativa ya que existe similitud en la toma de datos de los factores B y D.

Al tomar en cuenta las interacciones se puede observar que existe diferencia significativa en la interacción A*C, B*C y A*B*C, sin embargo, el factor A*B no se observa diferencia significativa por lo que existe igualdad en sus valores.

Tabla 21*Análisis de Varianza para Proteínas totales (mg/ml)*

<i>FV</i>	<i>SM</i>	<i>Gl</i>	<i>CM</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Medios de cultivo	766,63	2	383,315	1886,23	0,0000
B: Tipo de oxigenación	27,0975	1	27,0975	133,34	0,0000
C: Días de medición	119,365	4	29,8414	146,84	0,0000
D: Replicas	0,440523	2	0,220261	1,08	0,3450
INTERACCIONES					
AB	22,3031	2	11,1515	54,87	0,0000
AC	306,698	8	38,3372	188,65	0,0000
BC	28,2828	4	7,0707	34,79	0,0000
ABC	56,797	8	7,09962	34,94	0,0000
RESIDUOS	11,7866	58	0,203218		
TOTAL (CORREGIDO)	1339,4	89			

Nota. Considerar el valor $p \leq 0.05$.

Mediante la tabla 21 del análisis de varianza de proteínas totales considerando el valor de P y la significancia $p \leq 0.05$ se determinó que el medio de cultivo (Factor A), el tipo de oxigenación (Factor B) y los días de medición (Factor C) influye en la determinación de la cantidad de proteínas totales obtenidas, ya que, se observó diferencia significativa, mientras que en las réplicas (Factor D) no se observó diferencia significativa ya que existe similitud en la toma de datos.

Al tomar en cuenta las interacciones del análisis de varianza se puede observar que existe diferencia significativa en las interacciones A*B, A*C, B*C y A*B*C.

Tabla 22*Análisis de Varianza para Proteolíticas*

<i>FV</i>	<i>SM</i>	<i>Gl</i>	<i>CM</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS					
PRINCIPALES					
A: Medios de cultivo	0,000492113	2	0,000246056	3719,06	0,0000
B: Tipo de oxigenación	0,0000129201	1	0,0000129201	195,28	0,0000
C: Días de medición	0,00689863	4	0,00172466	26067,61	0,0000
D: Replicas	4,26667E-8	2	2,13333E-8	0,32	0,7257
INTERACCIONES					
AB	0,000004034	2	0,00000201744	30,49	0,0000
AC	0,000181192	8	0,000022649	342,33	0,0000
BC	0,0000190004	4	0,00000475011	71,80	0,0000
ABC	0,0000138162	8	0,00000172703	26,10	0,0000
RESIDUOS	0,00000383733	58	6,61609E-8		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00762559	89			

Nota. Considerar el valor $p \leq 0.05$.

Mediante la tabla 22 del análisis de varianza de actividad enzimática de la proteasa (Proteolítica) considerando el valor de P y la significancia $p \leq 0.05$ se determinó que el medio de cultivo (Factor A), el tipo de oxigenación (Factor B) y los días de medición (Factor C) influye en la determinación de la cantidad de la actividad enzimática de la proteasa obtenida, ya que, se observó diferencia significativa, mientras que en las réplicas (Factor D) no se observó diferencia significativa ya que existe similitud en la toma de datos.

Al tomar en cuenta las interacciones del análisis de varianza se observó que existe diferencia significativa en todas las interacciones (Interacciones: A*B, A*C, B*C y A*B*C).

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

Tabla 23

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

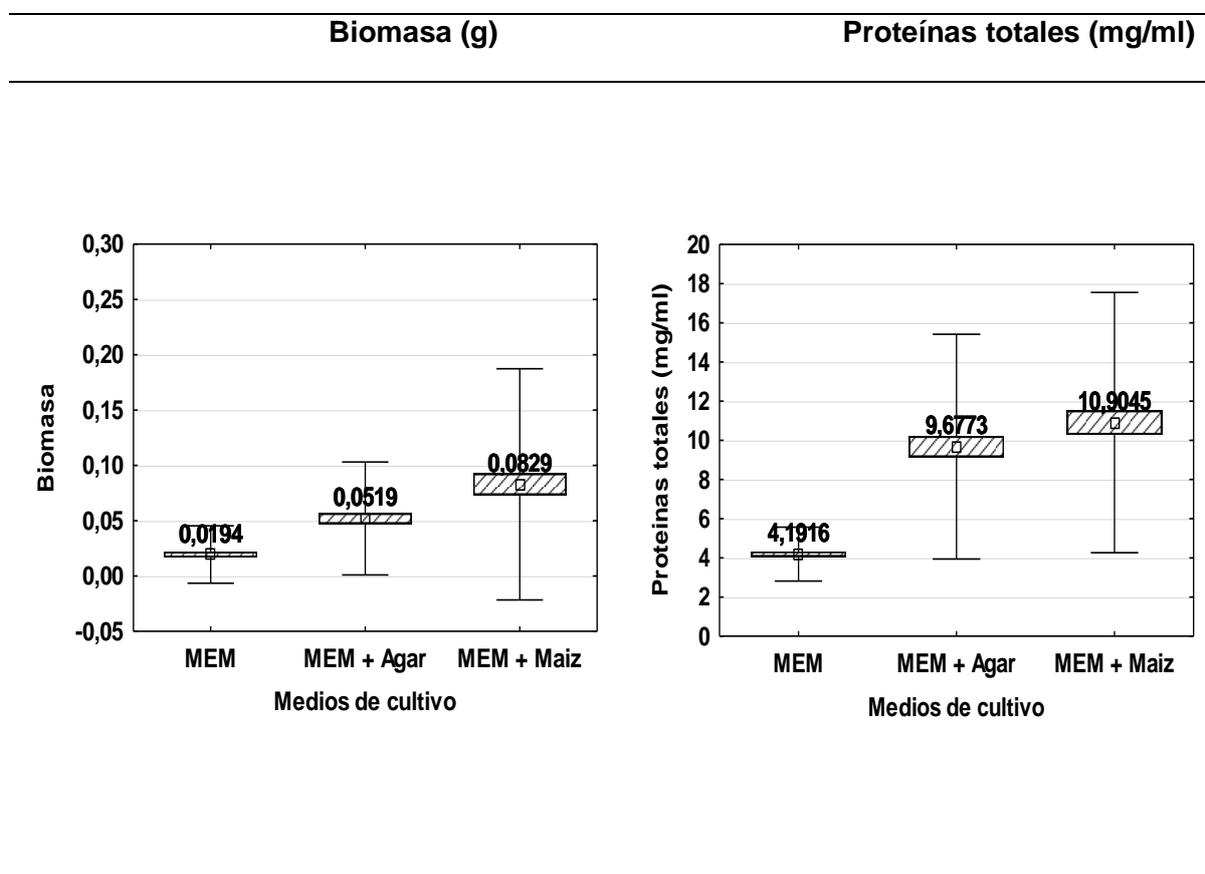
Medios de cultivo	Biomasa	Proteínas totales	Proteolíticas
MEM	0,02 ^A	4,19 ^A	0,03 ^A
MEM + Agar	0,05 ^B	9,68 ^B	0,04 ^B
MEM + Maíz	0,08 ^C	10,90 ^C	0,04 ^B

Nota. Las letras A-B indican la presencia de grupos homogéneos o independientes

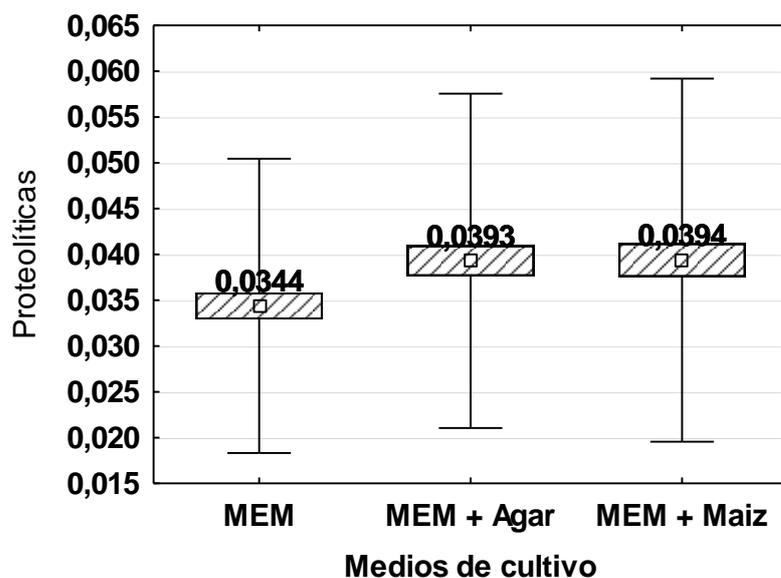
En la Tabla 23 se observa la prueba de Tukey con una significancia $p \leq 0.05$ analizando las variables estimadas de biomasa, proteínas totales y la actividad enzimática de proteasas con el medio de cultivo (Factor A) utilizado.

Figura 10

Efecto de los medios de cultivo sobre las variables



Actividad enzimatica de proteasas (UI/ml).



Nota. Efecto del crecimiento de las diferentes variables en relación al medio de cultivo.

En la Figura 10 Se determino la diferencia significativa en la biomasa del medio de cultivo donde se observó mejores resultados en el medio de cultivo mínimo enriquecido más maíz (MEM + Maíz) con un total de 0.0829 g, mientras que se observó lo opuesto para el medio de cultivo mínimo enriquecido más agar (MEM + Agar) con un total de 0.0519 g, al tomar en cuenta el valor del medio de cultivo mínimo enriquecido (MEM) cuyo valor es de 0.0194 g se determinó que mientras no exista una fuente de carbono no surgirá cambio o variación alguna en la toma de datos.

Con respecto a la gráfica de proteínas totales se observó que de igual forma el medio de cultivo mínimo enriquecido más maíz (MEM + Maíz) obtuvo resultados favorables en el desarrollo del experimento con un total de 10,9045 g/ml de proteínas totales, mientras que el medio de cultivo mínimo enriquecido más agar (MEM + Agar) obtuvo un valor similar con un total de 9.6773 g/ml de proteínas totales y al hacer la comparación con el medio de cultivo mínimo enriquecido (MEM) el cual obtuvo valores desfavorables en desarrollo con un total de 4.1916 g/ml ya que se usó como control para evaluar el crecimiento de la proteínas totales en el medio.

Mediante la gráfica de la actividad enzimática de proteasas (Proteolítica) se pudo determinar que no varía mucho entre el MEM + Agar y el MEM + Maíz; ya que el medio de cultivo mínimo enriquecido de maíz obtuvo un total de 0.0394 UI/ml, mientras que el medio de cultivo mínimo enriquecido de agar tubo un valor de 0.0393 UI/ml por lo que se dedujo que la fuente de carbono no influye en el desarrollo de actividad proteolítica y al comparar estos datos con el medio de cultivo mínimo enriquecido el cual obtuvo un valor de 0.0344 UI/ml lo cual es un dato desfavorable debido a que este medio no tuvo una fuente carbono que permita al microorganismo desarrollarse.

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

Tabla 24

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

Tipo de oxigenación	Biomasa	Proteínas totales	Proteolíticas
Sin agitación	0,05 ^A	7,71 ^A	0,04 ^A
Con agitación	0,05 ^A	8,81 ^B	0,04 ^B

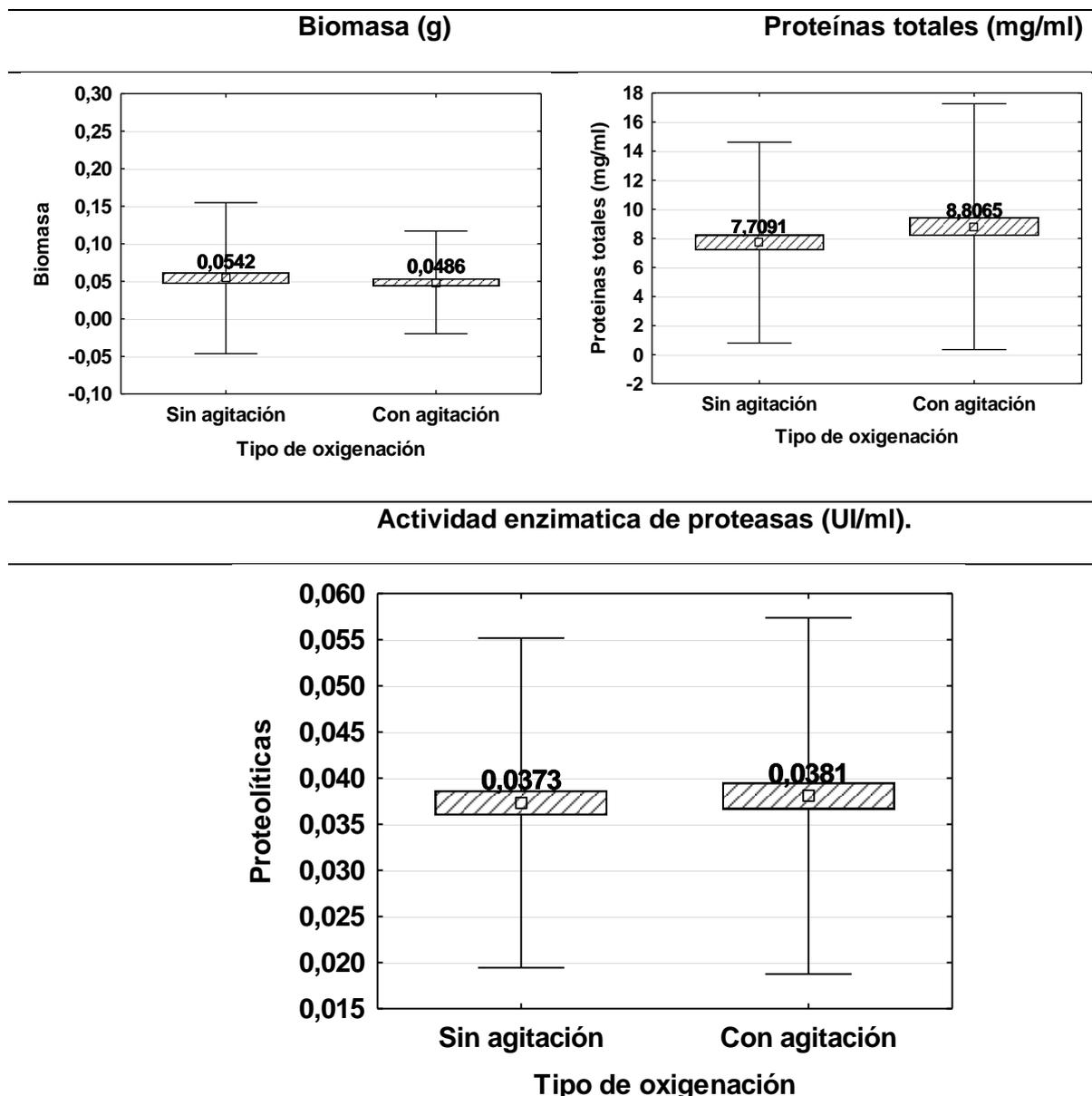
Nota. Se observan grupos totalmente diferentes.

En la Tabla 24 se observa la prueba de Tukey con una significancia $p \leq 0.05$ analizando las variables estimadas de biomasa, proteínas totales y la actividad enzimática de proteasas con el tipo de oxigenación (Factor B) aplicado.

Figura 11

Efecto del tipo de oxigenación sobre las variables

Nota.



Nota. Efecto del crecimiento de las diferentes pruebas con relación al tipo de oxigenación.

La figura 11 determina los valores de la prueba de Tukey con una significancia $p \leq 0.05$ analizando las variables estimadas de biomasa, proteínas totales y la actividad enzimática de proteasas si influye el tipo de oxigenación en la toma de datos (Factor B)

En el gráfico de biomasa se puede determinar que el mejor método establecido en la toma de datos es la variable sin agitación ya que obtuvo un valor de 0.0542 g, mientras que

la variable con agitación no tuvo valores favorables para el estudio ya que obtuvo un valor de 0.0486 g, por lo que se determina que el microorganismo se desarrolla mejor en condiciones anaeróbicas para la producción de biomasa.

Al tomar en cuenta la gráfica de proteínas totales se puede observar que la variable que obtuvo mejores resultados fueron los medios de cultivo con agitación (condición aeróbica) ya que obtuvo un valor de 8.8065 mg/ml, mientras que la condición sin agitación obtuvo valores un poco desfavorables para la obtención de proteínas totales con un total de 7.7091 mg/ml por lo que se determinó que para la obtención de proteínas totales la mejor condición es con aeración.

Mediante la figura de la actividad enzimática de la proteasa se puede determinar que para este factor no influye mucho el tipo de oxigenación ya que se obtuvo valores casi similares ya que con agitación se obtuvo un valor de 0.0373 UI/ml, mientras que el método sin agitación tuvo un valor un poco más elevado con un total de 0.0381 UI/ml.

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

Tabla 25

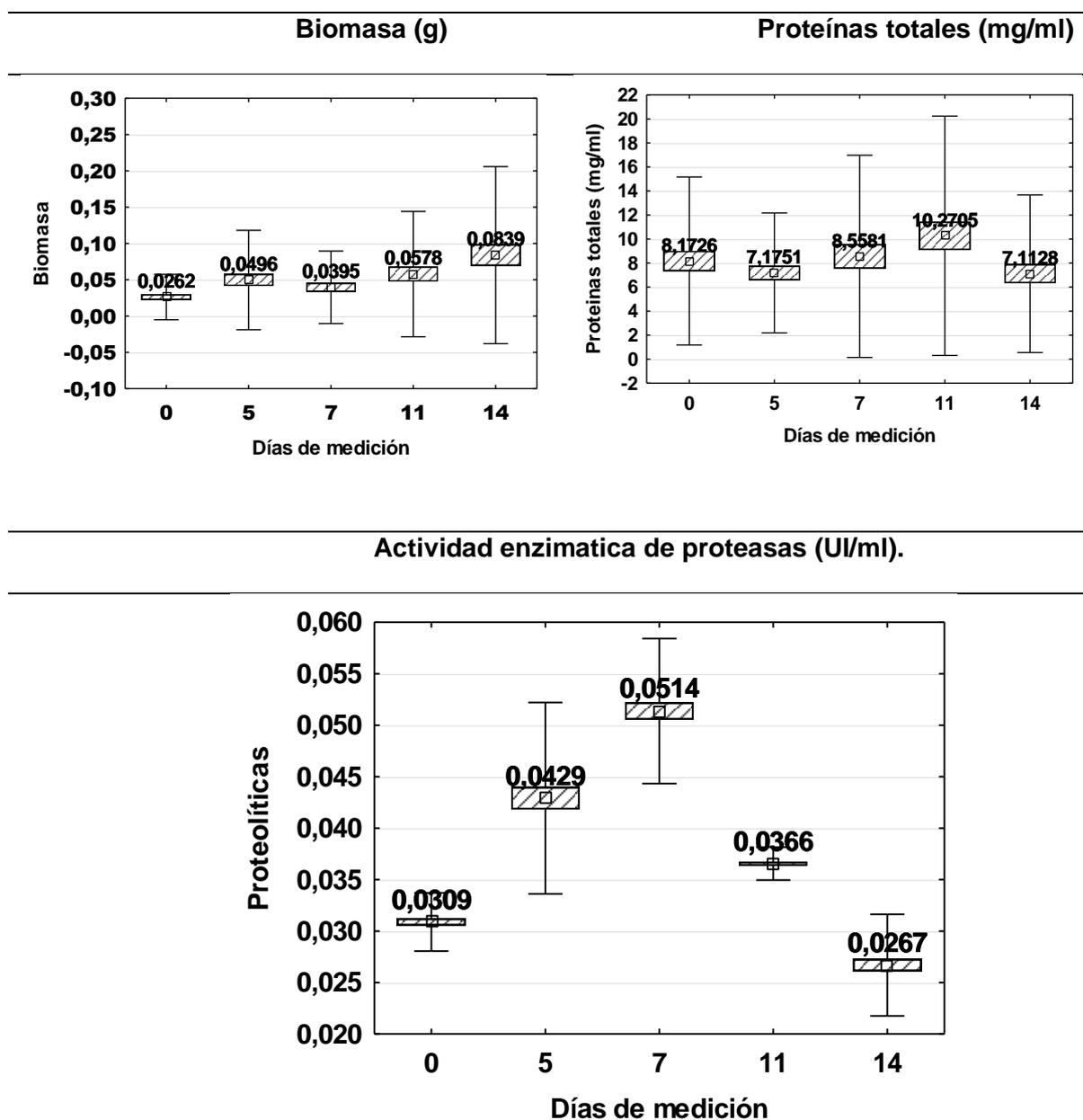
Días de medición	Biomasa	Proteínas totales	Proteolíticas
0	0,03 ^A	8,17 ^B	0,03 ^B
5	0,05 ^{AB}	7,18 ^A	0,04 ^D
7	0,04 ^{AB}	8,56 ^B	0,05 ^E
11	0,06 ^B	10,27 ^C	0,04 ^C
14	0,08 ^C	7,11 ^A	0,03 ^A

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

Nota. Las letras AB indican la existencia de grupos homólogos.

Figura 12

Efecto de los días de medición sobre las variables



Nota. Efecto del crecimiento de las diferentes variables en relación al tiempo.

La figura 12 determina los valores de la prueba de Tukey con una significancia $p \leq 0.05$ analizando las variables estimadas de biomasa, proteínas totales y la actividad enzimática de proteasas si influye la toma de datos en los diferentes días (Factor C).

Mediante la gráfica de biomasa se observó que existe mayor concentración de biomasa en el día 14 con un total de 0.0839 g/ml, seguido del día 11 con un total de 0.0578

g/ml y del día 5 con un total de 0.0496 g/ml, sin embargo, se presentó datos desfavorables del día 0 con un total de 0.0262 g/ml y del día 7 con un total de 0.0395 g/ml.

Al comparar el grafico de proteínas totales en los diferentes días se observó que el día que obtuvo mayor productividad con valores altos es el día 11 con un total de 10.2705 mg/ml seguido del día 7 con un total de 8.5581 mg/ml y finalmente el día 0 con un total de 8.1726 mg/ml, sin embargo, hubo dos días en los cuales se obtuvo valores desfavorables que son el día 5 con un total de 7.1751 mg/ml y el día 14 con un total de 7.1128 mg/ml lo que se debe a que en medio de fermentación existen picos de proteínas donde en ciertos días se potencia su productividad.

La actividad enzimática de la proteasa mediante su grafico se determinó que el día que obtuvo mejores resultados es el día 7 con un total de 0.0514 UI/ml seguido del día 5 con un total de 0.0429 UI/ml, sin embargo, hubo días en los que la actividad enzimática de la proteasa era muy baja siendo desfavorable para el ensayo como el día 11 con un total de 0.0366 UI/ml seguido del día 0 con un total de 0.0309 UI/ml y finalmente el día 14 con un total de 0.0267 UI/ml donde comienza a decrecer obteniendo valores inferiores al día cero.

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

Tabla 26

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

Interacciones	Biomasa	Proteínas Totales	Actividad Proteolítica
Mem + Sin agitación + 0	0,01 ^A	4,60 ^A	0,03 ^C
Mem + Sin agitación + 5	0,02 ^{AB}	3,79 ^A	0,04 ^{FG}
Mem + Sin agitación + 7	0,02 ^{AB}	4,40 ^A	0,05 ^I
Mem + Sin agitación + 11	0,03 ^{AB}	3,40 ^A	0,03 ^F
Mem + Sin agitación + 14	0,01 ^{AB}	4,96 ^A	0,02 ^A

Interacciones	Biomasa	Proteínas	Actividad Proteolítica
		Totales	
Mem + Con agitación + 0	0,02 ^B	4,81 ^A	0,03 ^C
Mem + Con agitación + 5	0,01 ^A	3,92 ^A	0,04 ^G
Mem + Con agitación + 7	0,01 ^A	3,73 ^A	0,05 ^I
Mem + Con agitación + 11	0,01 ^A	3,98 ^A	0,04 ^{FG}
Mem + Con agitación + 14	0,06 ^{ABC}	4,33 ^A	0,02 ^A
Mem + Agar + Sin agitación + 0	0,03 ^{AB}	12,35 ^{EFG}	0,03 ^{DE}
Mem + Agar + Sin agitación + 5	0,05 ^{ABC}	8,13 ^{BCD}	0,04 ^H
Mem + Agar + Sin agitación + 7	0,05 ^{ABC}	9,02 ^{CD}	0,05 ^{JK}
Mem + Agar + Sin agitación + 11	0,06 ^{ABC}	10,68 ^{DEF}	0,04 ^G
Mem + Agar + Sin agitación + 14	0,08 ^{ABCD}	5,69 ^{AB}	0,03 ^C
Mem + Agar + Con agitación + 0	0,03 ^{AB}	12,80 ^{FGH}	0,03 ^E
Mem + Agar + Con agitación + 5	0,05 ^{ABC}	9,47 ^{CD}	0,05 ^{HI}
Mem + Agar + Con agitación + 7	0,05 ^{ABC}	8,50 ^{CD}	0,05 ^{JK}
Mem + Agar + Con agitación + 11	0,04 ^{ABC}	14,78 ^{GH}	0,04 ^G
Mem + Agar + Con agitación + 14	0,09 ^{ABCD}	5,36 ^A	0,03 ^{CD}
Mem + Maíz + Sin agitación + 0	0,05 ^{ABC}	5,92 ^{AB}	0,03 ^{DE}
Mem + Maíz + Sin agitación + 5	0,09 ^{ABCD}	7,96 ^{BC}	0,05 ^I
Mem + Maíz + Sin agitación + 7	0,05 ^{ABC}	10,61 ^{DEF}	0,05 ^J
Mem + Maíz + Sin agitación + 11	0,10 ^{BCD}	15,09 ^H	0,04 ^{FG}
Mem + Maíz + Sin agitación + 14	0,16 ^D	9,04 ^{CD}	0,03 ^B
Mem + Maíz + Con agitación + 0	0,03 ^{AB}	8,55 ^{CD}	0,03 ^E
Mem + Maíz + Con agitación + 5	0,05 ^{ABC}	9,79 ^{CDE}	0,05 ^I
Mem + Maíz + Con agitación + 7	0,05 ^{ABC}	15,09 ^H	0,06 ^K
Mem + Maíz + Con agitación + 11	0,12 ^{CD}	13,70 ^{GH}	0,04 ^G
Mem + Maíz + Con agitación + 14	0,09 ^{ABCD}	13,29 ^{GH}	0,03 ^{BC}

Nota. Observar los grupos que poseen la misma letra.

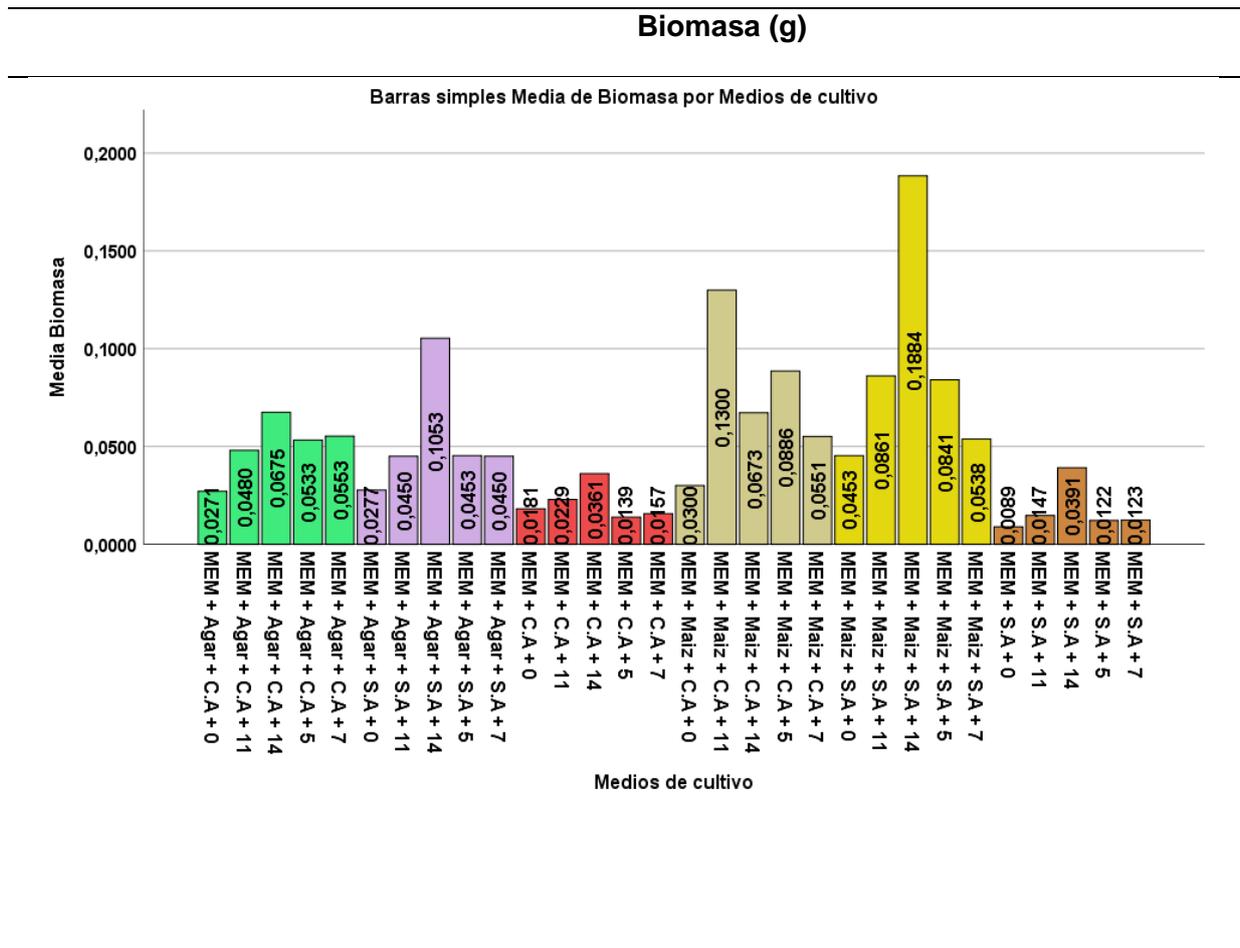
Mediante la tabla 26 se puede observar la diferencia entre los tratamientos que se evaluaron mediante la interacción A*B*C evaluando los grupos homólogos entre los mismos. Encontrándose 30 grupos homólogos para la biomasa, mientras que para proteínas totales y actividad proteolítica. Pero se obtuvo mejores resultados en la biomasa en los grupos del MEM + Mais con agitación del día 14 y sin agitación del día 11, mientras que para proteínas totales se obtuvo mejores resultados MEM + Mais con agitación del día 07 y sin agitación del día 11.

Figura 12

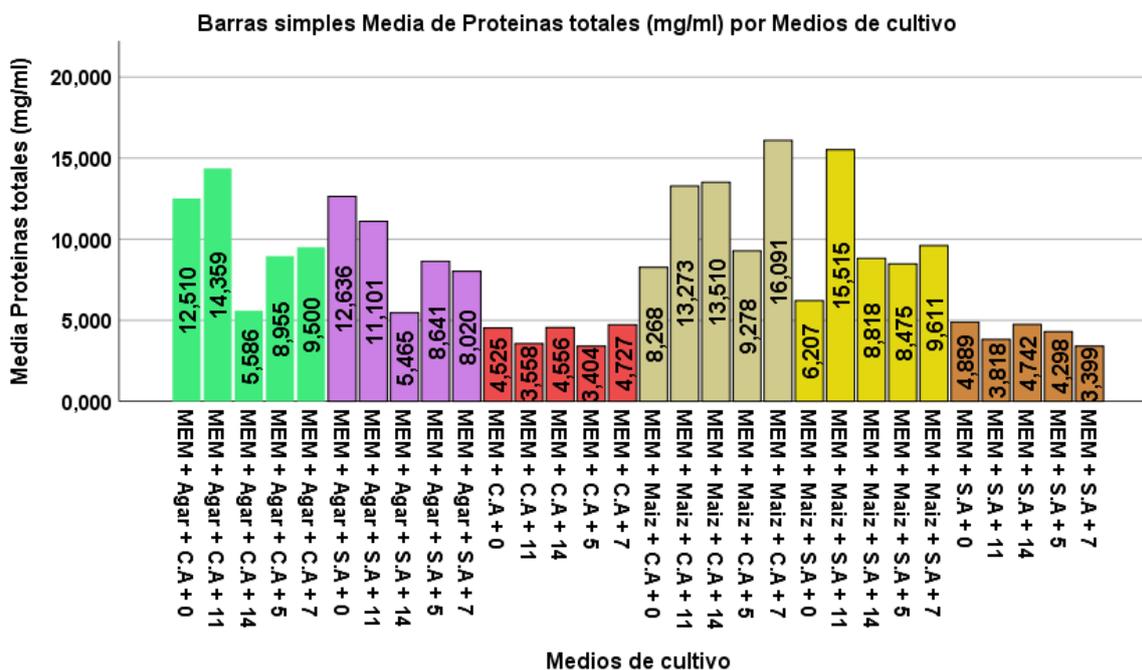
Prueba de significación de Tukey para Medios de cultivo (Factor A*B*C)

Figura 13

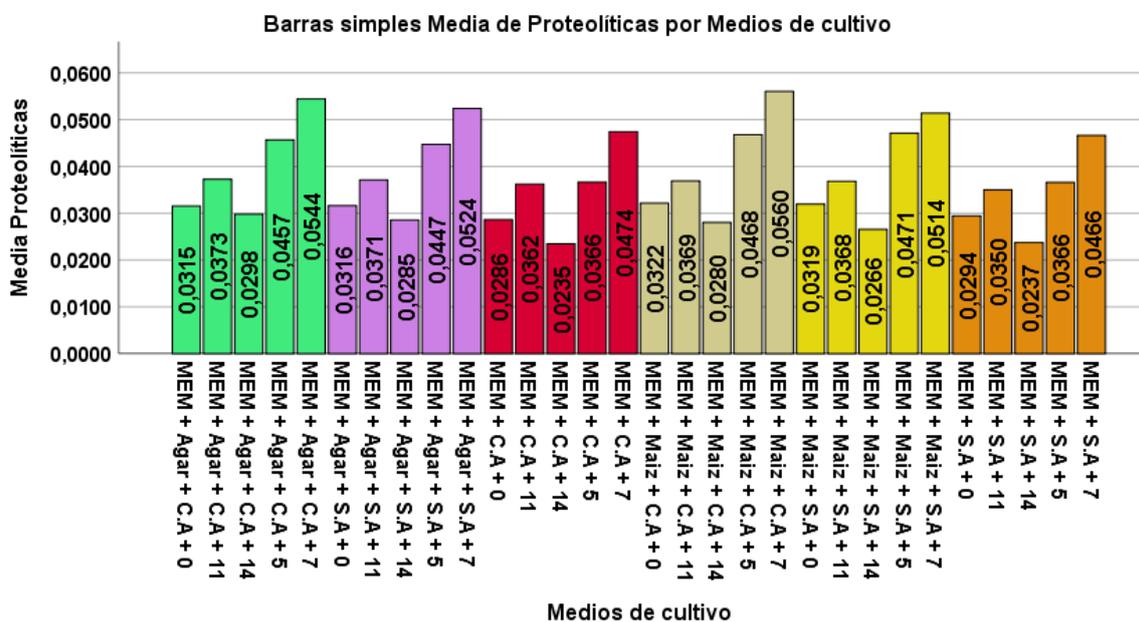
Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$), medios de cultivo *tipo de oxigenación *Días de medición (Factor A*B*C)



Proteínas totales



Actividad enzimática de proteasas (UI/ml).



Nota. Diagrama de barras de los medios de cultivos.

La figura 13 de la prueba de significancia de Tukey para los medios de cultivo se observó que en la gráfica de biomasa se obtuvo mejores resultados en el medio de cultivo

mínimo enriquecido del maíz sin agitación al catorceavo día con un total de 0.1884 g de biomasa en el medio, seguido del mismo medio pero con agitación al onceavo día con un valor total de 0.1300 g de biomasa, mientras que el medio de cultivo mínimo enriquecido de agar no obtuvo datos favorables ya que la concentración de biomasa es baja obteniendo el mejor resultado en el medio de cultivo mínimo enriquecido del agar sin agitación al catorceavo día con un total de 0.1063 g de biomasa seguido del mismo medio con agitación en el mismo día con un valor de 0.0675 g de biomasa, por lo que se concluye que para la obtención de biomasa a gran escala es el medio mínimo enriquecido con maíz al catorceavo día, sin embargo al comparar con los valores del medio mínimo enriquecido sin fuente de carbono se deduce que el microorganismo *penicillium* necesita una fuente de carbono para poder desarrollarse ya sea en ambientes con o sin aireación ya que en estos valores no se notó cambio alguno en el transcurso de los días.

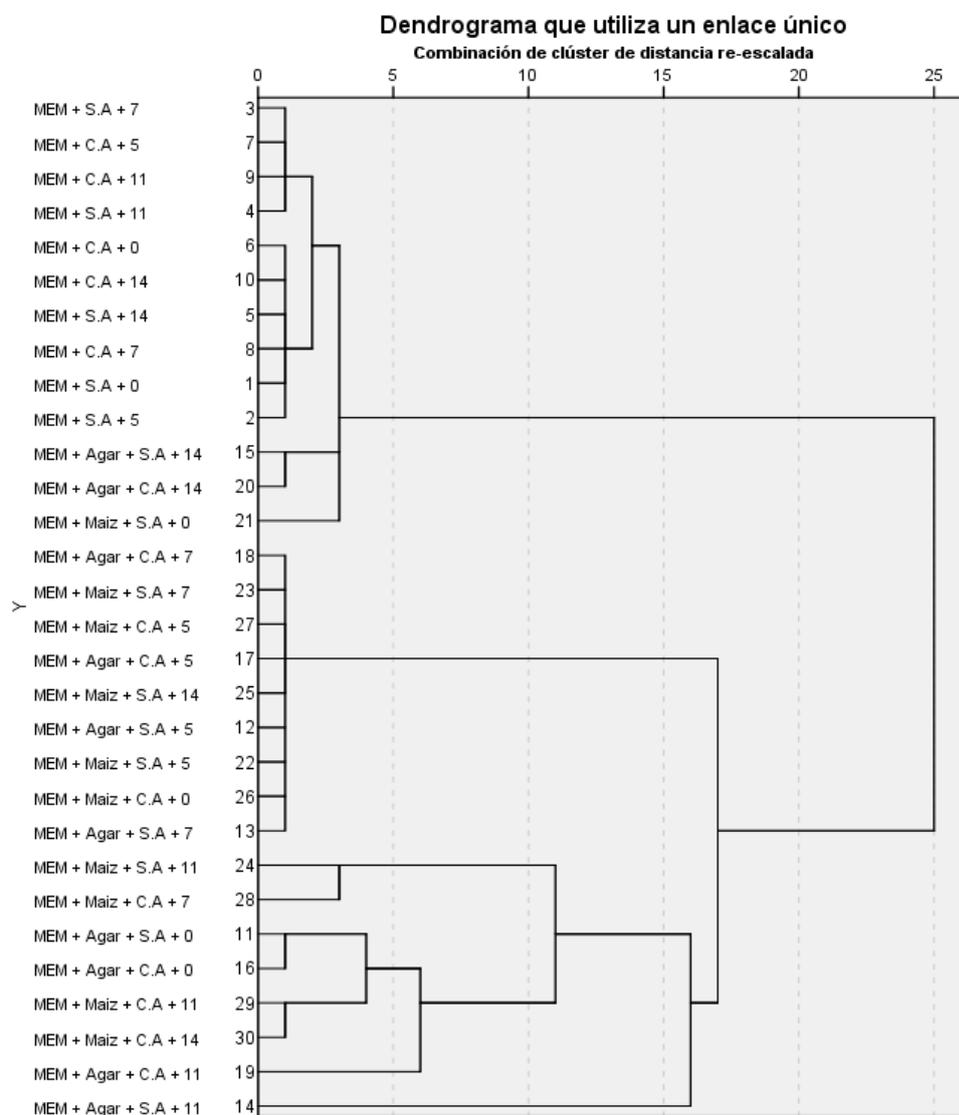
Mediante la gráfica de proteínas totales se determinó que el medio de cultivo mínimo enriquecido del maíz con agitación posee mejor rendimiento en la obtención de proteínas en tres días siendo el mejor en el día 7 con un total de 16.091 mg/ml ya que se obtuvo mayor concentración de proteína seguido del día 14 con un total de 13.510 mg/ml y el día 11 con un total de 13.273 mg/ml, mientras que en los días 0 y 5 no se obtuvieron datos favorables ya que sus valores son bajos, sin embargo no se descartaría ya que poseen niveles estándares de proteína, sin embargo al analizar el mismo medio pero sin agitación se obtuvo mejor rendimiento de proteínas en el día 11 con un total de 15.515 mg/ml, mientras que los días 7, 5 y 14 obtuvieron valores casi similares sin mucha diferencia y el día cero obtuvo el valor más bajo en la toma de datos con un total de 6.207 mg/ml de proteínas totales. Al analizar los valores del medio de cultivo mínimo enriquecido del agar con agitación se observó que hubo mayor rendimiento en los medios con agitación ya que presento valores favorables en el día 11 con un total de 14.359 mg/ml y en día 0 con 12.510 mg/ml, sin embargo, se observaron datos desfavorables en el día 7 con un total 9.500 mg/ml, en el día 5 con 8.555 mg/ml y en el día 14 con 5.586 mg/ml. Al tomar en cuenta el

mismo medio, pero sin agitación se observó que los días que tiene mayor rendimiento son el día 0 con un total de 12.636 mg/ml y el día 11 con 11.101 mg/ml, seguido de los días 5 con 8.641 mg/ml y día 7 con 8.020 mg/ml cuyos valores son bajos en comparación a los primeros datos mencionados, sin embargo, al tomar en cuenta el valor del día 14 con 5.465 mg/ml se observó que cuyo valor es el más bajo siendo éste desfavorable para el ensayo. Al tomar en cuenta los valores de los medios mínimos enriquecidos tanto con agitación y sin agitación se observó que posee valores similares de proteínas totales y que su variación en el transcurso del tiempo no tiene un gran cambio.

En el gráfico de la actividad enzimática de la proteasa se observó que los tres medios obtuvieron datos favorables en las dos condiciones con y sin agitación en diferentes días sin embargo, los valores más altos se evidenciaron en el medio de cultivo mínimo enriquecido del maíz con agitación con un total de 0.0560 UI/ml, seguido del medio de cultivo mínimo enriquecido con agitación con un total de 0.0544 UI/ml y finalmente el medio de cultivo mínimo enriquecido con agitación con un total de 0.0474 UI/ml. Al tomar en cuenta los medios sin agitación se observó que valor más alto fue el medio que contenía agar con un total de 0.0524 UI/ml seguido del medio que contenía maíz con un total de 0.0514 UI/ml y finalmente el medio mínimo enriquecido con un total de 0.0466 UI/ml, sin embargo, al tomar en cuenta el día 14 de todos los medios y de las dos condiciones se observó que existían datos desfavorables ya que a partir de ese día la actividad proteolítica comienza a decrecer.

Figura 14

Dendrograma entre las variables



Nota. Observar las líneas para determinar su relación, entre más cercanos más relación poseen y entre mas distante menor es su relación.

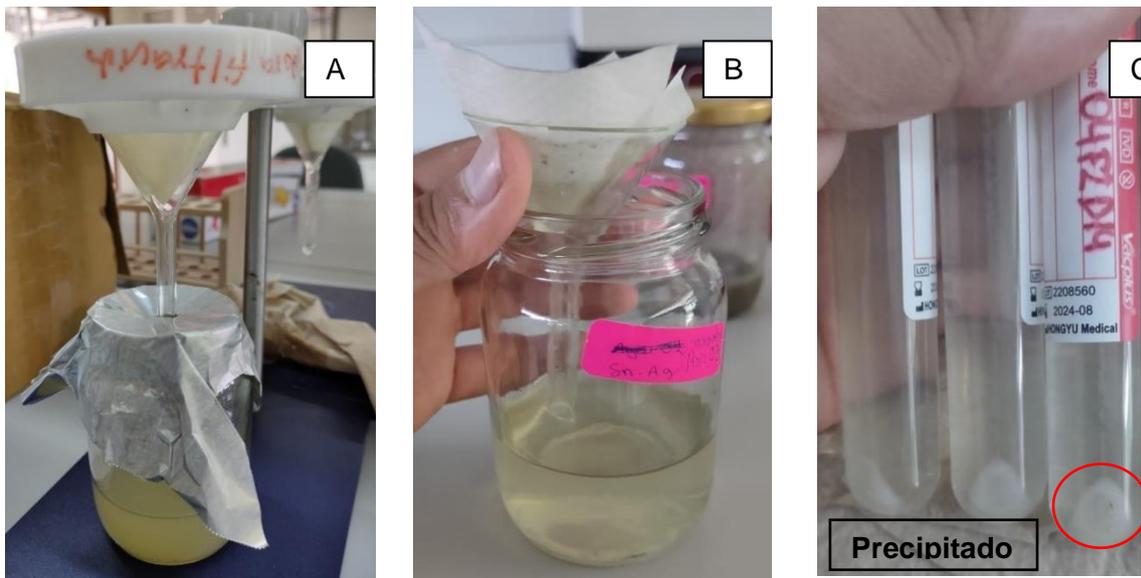
En la figura 14, se detalla un Dendrograma de los vecinos más próximos aplicando diferentes medios de estudio con variables (biomasa, proteínas totales y actividad enzimática de las proteasas), tomando en cuenta el tipo de oxigenación (con agitación y sin agitación) y los diferentes días de medición. Se observó que existe relación en todos los medios en los diferentes días tomando en cuenta que poseen dos condiciones distintas, sin embargo, se establece que pueden ser vecinos próximos sin importar la condición, además

también se puede observar tomando en cuenta la distancia de las líneas que algunos medios no tienen mucha relación entre los mismos.

Purificación

Figura 15

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



Nota. Purificación de los medios.

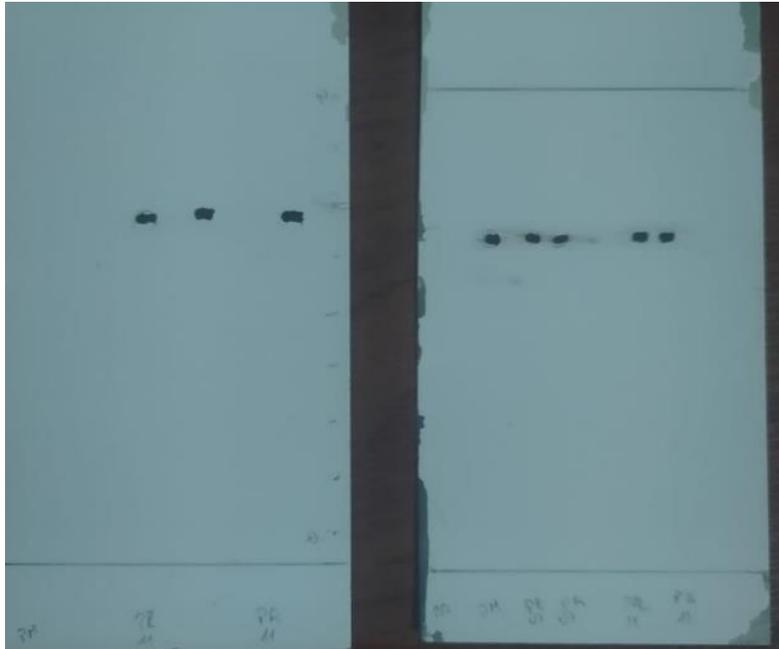
Mediante la filtración se separó el sobrenadante del precipitado que se presentaba en cada medio de cultivo (Figura 15 A), al centrifugar los mismos medios y nuevamente filtrarlos se observó que el medio se iba aclarando pasando de un color amarillo (agar) o café (maíz) a un color pajizo (Figura 15 B) y finalmente al colocarle sulfato de amonio formó un sobrenadante transparente y un precipitado blanco (Figura 15 C).

Una vez purificado se retiró el sobrenadante y se pesó el precipitado de los diferentes medios en el cual se obtuvo un total de 4.58 g en 250 ml de biofármaco del maíz sin agitación y con agitación se obtuvo 3.9 g en 250 ml; mientras que el medio del agar con agitación se obtuvo un total 4.10 g en 250 ml y sin agitación 3.2 g en 250 ml.

Cromatografía de capa fina

Figura 16

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



Nota. Los puntos indican el recorrido del fármaco comercial y del biofármaco.

Mediante la cromatografía de capa fina se observó que tanto como la penicilina comercial como el biofármaco obtenido recorrieron la misma distancia en la lámina de sílice por lo que se plantea que puede ser penicilina.

Se calculó el factor de retención R_f mediante la fórmula planteada por (Sandoval Perez & Chávez Vásquez, 2015)

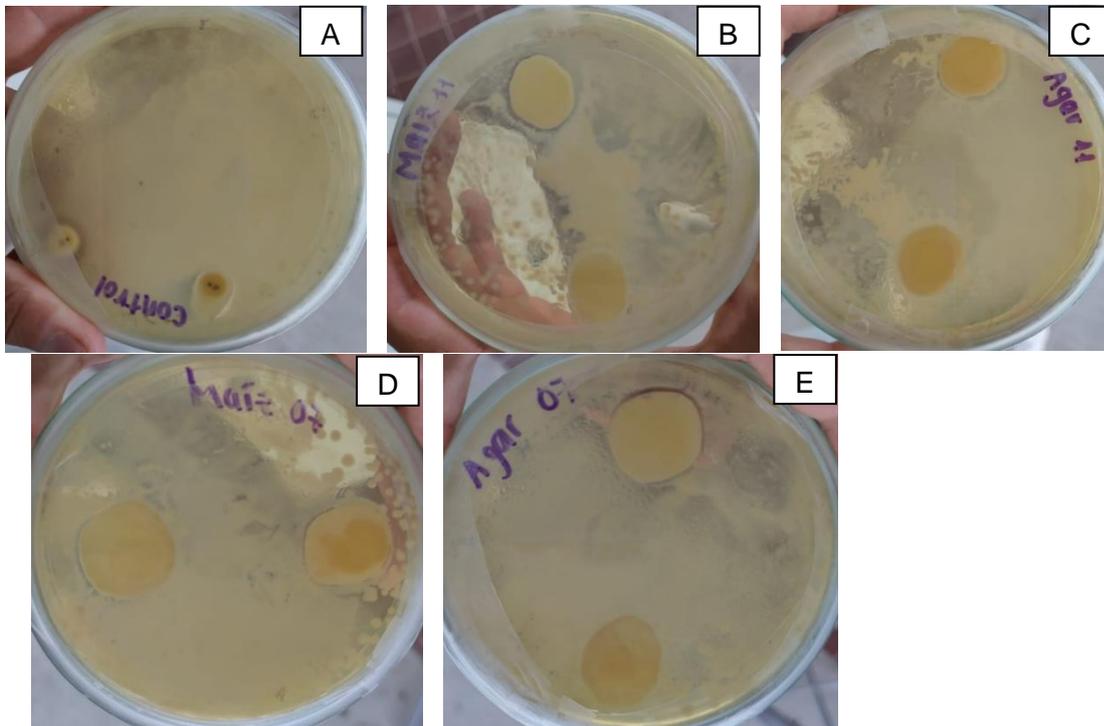
$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

Obteniendo un valor de R_f de 0.83 total de la penicilina comercial y del biofármaco obtenido de la fermentación del agar y maíz por lo que se deduce que el biofármaco obtenido es penicilina.

Antibiograma

Figura 17

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

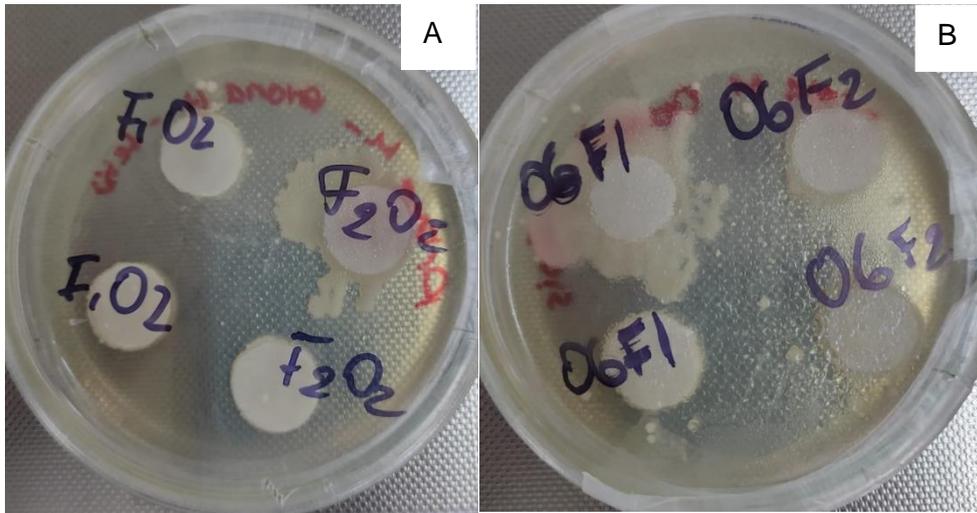


Nota. Halos de inhibición producidos por el disco que contienen biofármaco del día 7 y 11, al día 8 de la siembra.

Mediante el antibiograma se observó que el biofármaco obtenido es un antibiótico ya que presenta un halo de inhibición bacteriana en la siembra que se realizó de acuerdo a los días que presentaban mayor concentración de proteína (día 7 y 11). Al comparar con el control el cual era un disco de penicilina (Figura 17 A) se observó que tanto en el biofármaco obtenido del maíz (Figura 17 B) y agar (Figura 17 C) del día 11 tenían mejores resultados ya que el halo de inhibición era de mayor tamaño, mientras que en el biofármaco del maíz (Figura 17 D) y agar (Figura 17 E) del día 7 presentaron un halo de inhibición no tan pronunciado. Esto se debe a que al ser un antibiótico es capaz de atacar bacterias gram positivas o gram negativas impidiendo su desarrollo.

Figura 18

Antibiograma al tercer día de los días 5 y 14 del biofa producido por el agar y maíz.



Nota. Antibiograma del día 5 y 14 al tercer día del medio con biofármaco agar (A) y maíz (B).

Al inicio se desarrolló antibiogramas del día 5 y del 14, sin embargo, no se observó halo de inhibición ya que la bacteria se propagaba por toda la caja y encima de los discos (figura 18 A, B) del antibiograma debido a que la concentración del antibiótico en esos días era muy baja, de igual forma la concentración con la que se cargaba el disco del antibiograma ya que solo se usó 20 ul de las soluciones obtenidas de los medios de cultivos fermentados.

Cabe recalcar que la concentración del antibiótico también influye en la inhibición del desarrollo del microorganismos ya que a concentraciones muy bajas puede funcionar el antibiótico destruyendo las células bacterianas mediante sus grupos betalactámicos, sin embargo las bacterias son organismos capaces de replicarse poco tiempo lo que les permitiría generar resistencia bacteriana a concentraciones bajas generando contaminación dentro de toda la placa y de los discos, por eso hay que tener en cuenta las concentraciones más altas del medio y del día para obtener datos favorables en la investigación.

Microencapsulación con alginato.

Figura 19

Biofármaco encapsulado microencapsulación con alginato



Nota. Capsulas del biofármaco.

Mediante la solución de cloruro de calcio y el alginato se puede realizar una gelificación del biofármaco adoptando una forma circular en forma de capsula donde su estructura externa es blanda, y de color blanquecino e internamente es líquida, capaz de romperse al ejercer una presión mínima.

Según se observó el alginato al combinarse con una solución, actúa como un gelificante, en este caso se mesclo con la solución obtenida del biofármaco purificado del agar y maíz y se observó que tomo una textura viscosa, mientras que para formar la esterificación directa de la solución del alginato se utiliza un baño de cloruro de calcio que va a actúa como gelificador ya que al combinar las dos soluciones se obtenía capsulas del biofármaco como se muestra en la figura 19.

Capítulo V

Discusión

En base a los resultados se determinó que el hongo del género *Penicillium* ataca a cítricos y es considerado como la podredumbre verde o azul afectando principalmente a agricultores en la producción y calidad de frutos cítricos, aparte son considerados nocivos para el medio ambiente y el ser humano generando contaminación por sus esporas (Soliz Santander et al., 2020). Lo cual es corroborado por (Fernández-Andrade et al., 2019) los cuales establecieron que el género *Penicillium* es un hongo filamentoso capaz de desarrollarse en diferentes ambientes de la naturaleza siendo estos utilizados en la industria farmacéutica y en la industria alimentaria, sin embargo, dependiendo su especie se las puede considerar patógenas o tóxicas para el ser humano ocasionando neumonitis por hipersensibilidad, siendo esta una enfermedad inflamatoria de los pulmones causada por la inhalación de las esporas del hongo. Por otra parte, (Robledo Buriticá y otros, 2019) menciona que este género crece en condiciones ambientales atacando principalmente a la superficie de la cascara de la naranja debido al crecimiento de sus micotoxinas y más cuando poseen condiciones ambientales favorables como temperatura, humedad y la composición química de los frutos como nutrientes, a su vez (Robledo Buriticá y otros, 2019) acota que este hongo descompone la fruta en par de días pudriéndola, aparecen en heridas o aberturas de la fruta aduriéndose al tejido, además también ataca a verduras y frutas como manzanas, cebollas, brevas, etc., y (Velásquez y otros, 2014) establece que las heridas generan aceite que benefician el crecimiento del hongo del género *Penicillium*.

Según (Hernández y otros, 2016) establece que los cítricos poseen un alto contenido de carbohidratos y pH bajos lo que los hace ideales para el crecimiento de hongos y levaduras, mientras que (Rodríguez Castillejos, 2018) detalla que los cítricos poseen una gran variedad de compuestos que favorecen al crecimiento del hongo *Penicillium* ya que el endocarpio del fruto contiene protopectina, pectina, azúcares, minerales, flavonoides, aminoácidos, vitaminas, etc., mientras que el mesocarpio contiene carotenoides, vitaminas, celulosas, carbohidratos solubles, protopectina, pectina, flavonoides y aminoácidos.

Además, el mismo autor menciona que el extracto del fruto contiene azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa, y ácidos cítricos.

Respecto a la aislación e identificación del hongo *Penicillium*

Este microorganismo mediante el ensayo se desarrolló al quinceavo día en la fruta mostrando indicios de crecimiento al quinto día lo cual es corroborado por (Parra y otros, 2018) ya que en su investigación establece que el hongo se desarrolla en la fruta al quinceavo día y en el medio de cultivo el género *P. Digitatum* crecía completamente al noveno día lo cual no concuerda ya que mediante el desarrollo se observó que el hongo se demoraba catorce días en crecer completamente en la caja Petri, sin embargo se podría decir que en este caso influye la temperatura ya que se incubó a 28 °C y las condiciones ambientales ya que en su metodología utilizan una temperatura de 25 °C y humedad relativa del 90 a 95% y tomando en cuenta la humedad relativa de Luz de América según lo establece (BG Consultores Asociados, 2015) varía entre el 70 al 90% dependiendo la época y la vegetación.

Los hongos pertenecientes al género *Penicillium* tienen la capacidad de crecer bastante rápido en comparación con otros hongos, para lo cual, parten de la formación de colonias blancas con una superficie semejante al terciopelo, que con el pasar del tiempo y dependiendo de la especie, podrán generar distintos colores y en los últimos días de crecimiento se forma una capa de esporas que están recubriendo y poseen un aspecto polvoriento. Cada colonia está conformada por el micelio de hifas delgadas septadas (Astorga, Zúñiga y Rivera, 2014) lo cual concuerda con los resultados obtenidos.

Llevar a cabo una tinción es uno de los pasos iniciales que se realiza en el laboratorio para poder realizar la identificación de un microorganismo patógeno, en donde, el microscopio es la principal herramienta. El azul de lactofenol, es un colorante ideal para conservar y realizar tinciones simples de hongos, el cual torna todas las estructuras de la muestra de un mismo tono y esto se debe a que las estructuras de los hongos tienen una composición química distinta a la del resto del área en la cual se encuentra la muestra (Corrales Ramírez & Caycedo Lozano, 2020). De igual manera, el azul de metileno es un

colorante que permite realizar una tinción simple en la cual facilita la observación de esporas e hifas de los hongos (Murillo, Mejía, Gaitán y López, 2022). Astorga, Zúñiga y Rivera (2014), mencionan que también emplearon la técnica de la cinta pegante con azul de lactofenol para poder observar *Penicillium* al microscopio.

Respecto al medio de cultivo

La producción de penicilina se puede obtener por diferentes medios de fermentación la cual se puede encontrar en diferentes estados como: solido, semilíquido y liquido donde se puede desarrollar el microorganismo siempre y cuando el medió contenga compuestos inorgánicos, orgánicos o sales que fortifiquen su desarrollo. Según (León León, 2008) un medio de cultivo enriquecido debe contener fuentes de compuestos inorgánicos como: hidrogeno, oxigeno, fosforo, potasio, azufre, magnesio, nitrógeno y pequeñas cantidades de hierro, cobre y zinc, establece que el pH es una variable que favorece el crecimiento por lo tanto sugiere que el medio de cultivo debe encontrarse en un intervalo de pH entre 4.5 a 5.0., otro factor que influye en el desarrollo del *Penicillium* es la oxigenación ya que este se desarrolla mejor en condiciones aeróbicas.

El uso del maíz como fuente de carbohidrato por su alto contenido de carbohidratos, de los cuales, aproximadamente el 2% del peso en seco lo conforman los azúcares del grano, en donde el 65% se encuentra principalmente en el germen. Estos azúcares están conformados principalmente por glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, rafinosa, y oligosacáridos. Estos granos contienen almidón como energía de reserva en forma de amilosa la cual constituye un 25 a 30% del almidón y amilopectina, la cual conforma un 70 a 75% del almidón. El segundo componente más abundante en los granos de maíz son las proteínas, conformando entre 6 a 12% del peso en seco, de los cuales, el 35% se encuentra en el germen. Los principales tipos de proteínas en el grano maíz son prolaminas, albúminas, globulinas y glutelinas. Los granos de maíz también contienen aminoácidos y lípidos, de los cuales, cerca del 39 a 47% de los lípidos se encuentran dentro del germen. Los minerales conforman el 1 a 1,3% del grano de maíz (Vásquez Muñoz & Vega Chicoma, 2019).

Respecto a las variables evaluadas

Al comparar los resultados obtenidos de la biomasa medida en transcurso del día cero al día catorce se observó que los valores obtenidos son bajos ya que en la investigación de (León León, 2008) obtuvo valores altos en el cuarto día con un total de biomasa de 0.56 g y 0.35 g al quinto día mediante la fermentación del *Penicillium chrysogenum* y *expansum* determinando que cada especie produce diferentes concentraciones de biomasa en diferentes periodos, mientras que la investigación de (Duque Vidal & Gutiérrez Beltrán, 2011) obtiene un valor de 0.059 g estableciendo que la producción de biomasa es favorable cuando el hongo *Penicillium S.P* posee fuentes de nitrógeno orgánicas interactuando con los aminoácidos esenciales de las levaduras como cofactores de crecimiento aumentando el rendimiento de la biomasa, lo cual se relaciona con los resultado obtenido en la investigación de 0.08 g.

Se determinó que la especie influye en el desarrollo de la obtención de la biomasa de la penicilina ya que en los resultados obtenidos de (León León, 2008) y (Parra y otros, 2018) demostrando que la biomasa puede variar según las especies de *Penicillium*. Además, la producción de Penicilina en algunas especies está severamente regulada por la fuente de carbono que se utilice, es así que, la glucosa y sacarosa afectan en mayor medida y en menor medida por maltosa, fructosa y galactosa, sin embargo, la lactosa no muestra este efecto regulador. Por ello, se utiliza lactosa como fuente de carbono, para de alguna manera, contrarrestar los efectos negativos de la glucosa y demás azúcares en la producción de Penicilina. Este efecto negativo también se puede reducir ligeramente utilizando estos azúcares en concentraciones no represoras (Rebeca, 2015).

Según (Rebeca, 2015), se ha demostrado que cuando las condiciones de crecimiento del hongo son muy favorables, la producción de penicilina no es muy óptima, no obstante, cuando las condiciones de crecimiento están ligeramente por debajo de lo normal, la producción de penicilina aumenta y esto se debe a que en 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*.

Se obtuvo una menor concentración de biomasa y proteínas en las fermentaciones con agitación en comparación a la fermentaciones sin agitación y esto puede deber a que, según (Meyer y otros, 2021), mientras más alta sea la agitación del medio y por ende, la frecuencia de circulación micelio en el mismo, más alto será el daño causado y por ende, la síntesis de penicilina por parte del cultivo será mucho menor.

El crecimiento de los hongos del género *Penicillium* al igual que la mayoría de los hongos filamentosos es afectada por varios factores físicos como el pH, temperatura, aireación y agitación, no obstante, también se debe considerar otros factores como la geometría del fermentador y los sistemas de agitación (Canteri & Ghoul, 2015). Los hongos heterótrofos como los del género *Penicillium* producen más biomasa si se utilizan fuentes de nitrógeno orgánicas en comparación con fuentes inorgánicas como en el caso del sulfato de amonio y esto se debe a que en las fuentes orgánicas pueden contener algunos aminoácidos esenciales, los cuales benefician el crecimiento del hongo, aumentando así la producción de biomasa, además, debido a su compleja estructura son degradados lentamente, favoreciendo la oxidación del amonio puesto que no se presenta la aglomeración de intermediarios al producir nitratos que serán asimilados por *Penicillium* (Duque Vidal & Gutiérrez Beltrán, 2011).

Mediante el análisis de proteína totales por el método de Biuret se obtuvo resultados favorables ya que el sulfato cúprico CuSO_4 permite medir por espectrofotometría la concentración de proteínas en una longitud de 540 nm al observar la figura 9 se pudo ver un ligero cambio de color, 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 estas coloraciones ya que reacciona con el Cu^{2+} . Este método se utiliza mediante una curva estándar de BSL permitiendo determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica (Fernández Reyes & Aurora Galván, 2006). No se han registrado estudios de la cuantificación de proteína mediante este método del reactivo de Biuret por espectrofotometría para el hongo *Penicillium*, sin embargo, se comparó con un estudio

realizado por (Acosta Guerrero, 2006) en el que utiliza como método la evaluación de proteína mediante electroforesis capilar de isoelectroenfoco donde determina que la concentración de proteína con mejor resultado del hongo *P.olsonii* es de 22.91 mUA y mediante la comparación de los resultados que se obtuvo en el desarrollo de la practica por el método de Biuret con un total de 16.091 mg/ml lo cual coincidiría entre los rangos de obtención de proteínas, considerando también que la especie es distinta a la nuestra.

La penicilina es considerada un antibiotico beta-lactamico que se utiliza para tratar infecciones bacterianas. La cromatografía de capa fina (TLC) se ha utilizado para determinar la pureza y cantidad de penicilina en diferentes muestras .

Los hongos poseen y tienen la capacidad de secretar proteasas, de las cuales, muchas se han caracterizado debido a su significancia biológica y a su valor económico (Barengo y otros, 2020). Las proteasas son enzimas muy valiosas para distintas áreas y enfoques de la biotecnología, ya que tienen la capacidad de funcionar como catalizadores biológicos muy específicos, no obstante, en muchos casos su utilización en las industrias se ve obstaculizada por sus elevados precios e inestabilidad, por lo cual es importante continuar en la búsqueda de proteasas que sean muy estables, económicas y que se puedan producir en grandes cantidades (Huaihua Puma, 2019).

La importancia de las proteasas se debe a que están juegan papeles extremadamente importantes para que transcurra la vida de todas las proteínas, y por ende, la vida en general puesto que las proteasas se encargan de asegurar el transporte como la activación de las proteínas a las que se les ha designado su función mientras se encargan de reciclar las proteínas que han cumplido su función o que han sufrido desgaste (Verhamme y otros, 2018)

En el cuerpo humano existen proteasas que cumplen con papeles importantes, sin embargo, existen patógenos que logran manipular ciertas proteasas importantes y logran provocar graves enfermedades. El funcionamiento de las proteasas requiere de un estricto control y en caso de que se produzca una interrupción en la actividad entre proteasa, sustrato e inhibidor, se pueden presentar problemas con patógenos que pueden terminar en

enfermedades infecciosas (Anes y otros, 2021). Las proteasas son esenciales en mecanismos reguladores de salud y enfermedad, es por ello que en un cuerpo sano, estas se mantienen severamente controladas y son las encargadas de mantener la homeostasis y permitir procesos de reparación y regeneración, no obstante, cuando no se encuentran reguladas pueden desencadenar enfermedades crónicas (Carroll y otros, 2021).

Respecto a la cromatografía en capa fina.

Se realizaron procesos de fermentación con un hongo del género *Penicillium* para obtener un bioproducto con posibles aplicaciones farmacológicas, por lo cual, para poder determinar el bioproducto obtenido se realizó una cromatografía de capa fina ya que según (Castillo y otros, 2007), existen varias técnicas de cromatografía, sin embargo, la cromatografía de capa fina es una opción sencilla y económica, eficiente para realizar el seguimiento al proceso de fermentación.

Respecto al antibiograma

El antibiograma es un protocolo que se utiliza a menudo en los laboratorios de microbiología y brinda mucha información, permitiendo así, realizar estrategias para una utilización óptima de los antibióticos (Alós & Rodríguez-Baño, 2010). El bioproducto obtenido se puso a prueba utilizando un antibiograma debido a que según (Truong y otros, 2021), los antibiogramas nos brindan medidas binarias de susceptibilidad, es decir, nos permite conocer si un microorganismo es susceptible o no.

Uno de los objetivos del antibiograma es poder determinar la sensibilidad de un determinado microorganismo a algún antibiótico (Martínez y otros, 2009). Además de obtener datos cualitativos que nos indican si la bacteria es resistente o no a determinado antibiótico, también se puede usar para obtener datos cuantitativos que permiten conocer la concentración mínima del bioproducto para inhibir el desarrollo de microorganismos (Cercenado & Saavedra-Lozano, 2009)

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que poseen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina y tienen la capacidad de inhibir las paredes celulares bacterianas, lo que provoca la muerte de las bacterias (Marín & Gudiol, 2002). Según (Castillo M. , 1980) la

penicilina tiene la capacidad no solo de detener la proliferación de bacterias, sino también, la capacidad de destruirlas ya ataca la pared celular, obstaculizando la actividad enzimática de las bacterias, transformando los glucopéptidos en monómeros más estables en las bacterias gram positivas y lipopolisacáridos de las bacterias gram negativas de tu enlace.

Capítulo VI

Conclusiones

En esta investigación fue posible obtener el biofármaco utilizando un microorganismo patógeno aislado, mediante un proceso de fermentación en un medio de cultivo que contenía carbohidratos, ya que se pudo evidenciar que en los dos medios restantes el microorganismo no generó el bioproducto.

Se logró aislar y purificar con éxito una cepa de hongo del género *Penicillium* a partir de un fruto cítrico. El género al cual pertenece el hongo aislado fue identificado mediante el análisis de la morfología del hongo, utilizando técnicas de microscopía. Esta cepa mostró en su crecimiento un micelio algodonoso inicialmente de color blanco, el cual, con el pasar de los días se tornó verde y finalmente azul turquesa.

La producción del biofármaco se determinó mediante la medición de parámetros como la biomasa producida, las proteínas totales y la actividad enzimática ya que estos compuestos producidos son característicos de un biofármaco. Por ello, se realizó también un antibiograma, con el cual se evidencio la actividad antibacteriana del bioproducto obtenido.

Factores como el PH, temperatura, agitación y fuentes de carbono pueden influir en la cantidad de metabolitos secundarios generada por los hongos del género *Penicillium*. Se pudo evidenciar que los mejores resultados para la cepa aislada en el presente estudio se dieron el tratamiento del medio con maíz sin agitación al onceavo día.

Los compuestos generados en la fermentación por la cepa del hongo en el medio que contenía carbohidratos son característicos de un biofármaco, por lo cual, como siguiente paso se realizó una cromatografía de capa fina comparando el bioproducto con el fármaco de referencia comercial, con lo cual se pudo determinar que la muestra comercial como el bioproducto obtenido mostraron resultados muy parecidos, con lo cual se considera que el bioproducto obtenido podría ser penicilina.

También fue posible purificar el biofármaco mediante procesos de precipitación y filtración y encapsular a este 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, ya que según la bibliografía variando el medio y la especie de microorganismo se puede obtener resultados favorables para biomasa, proteínas totales y la actividad proteolítica.

Para la obtención del biofármaco mediante este estudio es recomendable utilizar el medio de cultivo enriquecido con fuentes de compuestos orgánicos e inorgánicos.

Se recomienda utilizar lactosa en el medio enriquecido ya que esta permite mejorar la producción de penicilina para contrarrestar los efectos negativos de la glucosa.

Se recomienda que en este tipo de 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.

Capítulo VII

Bibliografía

- Acosta Guerrero, R. (2006). *Selección de Penicillium productores de péptidos antifúngicos para su utilización en productos cárnicos madurados*. Cáceres: Universidad de Extremadura. <https://biblioteca.unex.es/tesis/8477237379.pdf>
- Alós, J.-I., & Rodríguez-Baño, J. (2010). ¿Qué antibióticos debemos informar en el antibiograma y cómo? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(10). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.003>
- Álvarez Poblete, P., Farías Campos, N., & Ramos Bustamante, N. (2018). *Cuantificación espectrofotométrica de proteínas*. Universidad Santo Tomas. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/63232343/LAB_BIOQ_220200507-21855-73q0eu-libre.pdf?1588885664=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DCuantificacion_espectrofotometrica_de_pr.pdf&Expires=1676922494&Signature=A18tPLWvF5i59IL2HEcRG8wEzge1Cf
- Anes, E., Azevedo-Pereira, J. M., & Pires, D. (2021). Cathepsins and Their Endogenous Inhibitors in Host Defense During Mycobacterium tuberculosis and HIV Infection. *Frontiers in Immunology*, 12(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.726984>
- Ariyo, B., Tamerler, C., Bucke, C., & Keshavarz, T. (1998). *Enhanced penicillin production by oligosaccharides from batch cultures of Penicillium chrysogenum in stirred-tank reactors*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13198.x>
- Barengo, M. P., Amerio, N. S., Bich, G. A., Castrillo, M. L., & Zapata, P. D. (2020). *Estandarización del método cuantitativo de azocaseína para determinar la actividad proteolítica en sobrenadantes fúngicos de Escovopsis y Trichoderma*. *Elfos Scientiae*. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/143769/CONICET_Digital_Nro.3cba129f-a0e2-4466-b513-5966f86ed730_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y

- BG Consultores Asociados. (2015). *Actualización del diagnóstico del PDOT de la parroquia Luz de América*. Luz de América : BG Consultores Asociados.
<https://odsterritorioecuador.ec/wp-content/uploads/2019/04/PDOT-PARROQUIA-LUZ-DE-AMERICA-2015-2020.pdf>
- Butler, J. M., & Dressman, J. B. (2010). The developability classification system: Application of biopharmaceutics concepts to formulation development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(12). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.22217>.
- Cairns, T. C., Nai, C., & Meyer, V. (2018). How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biology and Biotechnology*, 5(13).
<https://link.springer.com/article/10.1186/s40694-018-0054-5>
- Canteri, H., & Ghouli, M. (2015). Submerged Liquid Culture for Production of Biomass and Spores of *Penicillium*. *Food Reviews International*, 31(3), 262 - 278.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1015136>
- Carroll, E. L., Bailo, M., Reihill, J. A., Crilly, A., Lockhart, J. C., Litherland, G. J., . . . Martin, L. (2021). Trypsin-Like Proteases and Their Role in Muco-Obstructive Lung Diseases. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 22(11).
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms22115817>
- Carsanba, E., Pintado, M., & Oliveira, C. (2021). *Fermentation Strategies for Production of Pharmaceutical Terpenoids in Engineered Yeast*. MDPI.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ph14040295>
- Castillo, G., Ortega, G., Carabeo, V., Delgado, G., & Michelena, G. (2007). Determinación cualitativa de giberelinas y auxinas por cromatografía de capa fina ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*, 41(1).
<https://www.redalyc.org/pdf/2231/223114967002.pdf>
- Castillo, M. (1980). *REVISION SOBRE PENICILINAS*. Repositorio CCSS.
<https://repositorio.binasss.sa.cr/xmlui/handle/20.500.11764/3952>

- Cercenado, E., & Saavedra-Lozano, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Anales de Pediatría Continuada*, 7(4).
[https://doi.org/DOI: 10.1016/S1696-2818\(09\)71927-4](https://doi.org/DOI: 10.1016/S1696-2818(09)71927-4)
- Corrales Ramírez, L. C., & Caycedo Lozano, L. (2020). Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. *Nova*, 18(33).
<https://doi.org/https://doi.org/10.22490/24629448.3701>
- Duque Vidal, J. M., & Gutiérrez Beltrán, J. A. (2011). *Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa y conidos de Penicillium sp. aislado de suelos de arroz del tolima*. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana.
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11777/DuqueVidalJuanManuel2011.pdf?isAllowed=y&sequence=1>
- Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Microbiol. Biotechnol*, 4(1).
http://www.bluepenjournals.org/ijambr/pdf/2016/October/Etebu_and_Arikekpar.pdf
- Fernández Reyes, E., & Aurora Galván, A. (2006). *Métodos para la cuantificación de proteínas*. Campus Universitario de Rabanales.
<https://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20METODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACION%20DE%20PROTEINAS.pdf>
- Fernández-Andrade, C., Santos, J., Nakamura, P. M., & Freitas, J. B. (2019). Hypersensitivity pneumonitis due to occupational exposure to fungi: a case-control study. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences. Academy of Sciences*(3), 91.
- Gomez, C., Sinche, M., Duchicela, J., Muñoz, R., & Castillo, P. (2012). Identificación de la actividad proteolítica en especies vegetales presentes en las provincias de Loja y Pastaza. *Revista Politécnica*, 31, 7.
https://revistapolitecnica.epn.edu.ec/ojs2/index.php/revista_politecnica2/article/view/1

- Hernández, M. d., Wong-Paz, J. E., Muñiz-Márquez, D. B., Carrillo-Inungaray, M. L., & Sánchez-González, J. M. (2016). Compuestos fenólicos bioactivos de la toronja (*Citrus paradisi*) y su importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47(2).
<https://www.redalyc.org/pdf/579/57956610003.pdf>
- Hernández, R. E., & Céspedes, J. (2020). Bioeconomía: una estrategia de sostenibilidad en la cuarta revolución industrial. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 7(2). http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2409-16182020000200015&script=sci_arttext
- Huaihua Puma, P. (2019). *Purificación, caracterización e inmovilización de proteasas de excreción de Staphylococcus sp. de las salineras de Maras - Cusco*. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
<http://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/3885>
- Inca Torres, A. R. (2019). *Revalorización de los subproductos de la industria de hongos y setas comestibles. Aplicación a la obtención de productos de alto valor añadido*. Bioquímica y Biología Molecular. Sevilla: Universidad de Sevilla.
<https://idus.us.es/handle/11441/89308>
- Izquierdo Poma, M. I., & Ramirez Camarena, L. A. (2019). *Determinación del efecto del tipo de sustrato y tipo de fuente de carbono, en la cinética de crecimiento del hongo Aspergillus Oryzae en medio sólido*. Universidad Nacional del Centro de Perú.
<http://hdl.handle.net/20.500.12894/5309>
- Kesik-Brodacka, M. (2017). Progress in biopharmaceutical development. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(3), 306 - 322.
<https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bab.1617>
- Ku, M. S. (2008). *Use of the Biopharmaceutical Classification System in Early Drug Development*. Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1208/s12248-008-9020-0>
- León León, C. (2008). *roducción y cuantificación de un antibiótico por electroforesis capilar*. Mexico: Instituto Politécnico Nacional.

<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/14528/ClaudiaLeon.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Löbenberg, R., & Amidon, G. L. (2000). Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 3 - 12.

<https://doi.org/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S093964110000916>

López, M. J., Suárez-Estrella, F., & Casco, J. M. (2018). Los microorganismos como elementos clave de la bioeconomía. *Mediterráneo económico*, 31(1).

<https://www.publicacionescajamar.es/publicacionescajamar/public/pdf/publicaciones-periodicas/mediterraneo-economico/31/31-802.pdf>

Lozada Tonato, H. O. (2018). *Análisis químico mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas del antibiótico producido por los géneros stenotrophomonas y burkholderia aislados de muestras de suelo*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15191/1/UPS-QT04295.pdf>

Marín, M., & Gudiol, F. (2002). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 21(1).

https://doi.org/https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/55928994/S0213005X03728730_S300_es-libre.pdf?1519836940=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAntibioticos_betalactamicos.pdf&Expires=1676968119&Signature=T5tclU3nFq9sPex0vHKjoyRIVqU1Kj9c5-5lqduR2zpUlwQ8q

Martínez, C., Obiols, C., Friso, N., A., G., M., G. A., & Escudero. (2009). *El antibiograma en la elección de una correcta terapéutica antimicrobiana*. Universidad Nacional La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/143332/Resumen.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Martinez, M., Augsburger, L., Johnston, T., & Warren Jones, W. (2002). Applying the Biopharmaceutics classification system to veterinary pharmaceutical products: part I: Biopharmaceutics and formulation considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(6), 805 - 824. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00070-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00070-4).
- Matar, P. (2020). Biofármacos y biosimilares. *Revista Argentina de Reumatología*(3), 9. http://revistasar.org.ar/revistas/2009/numero_3/articulos/editorial.pdf
- Meyer, V., Cairns, T., Barthel, L., King, R., Kunz, P., Schmideder, S., . . . Krull, R. (2021). Understanding and controlling filamentous growth of fungal cell factories: novel tools and opportunities for targeted morphology engineering. *Fungal Biol Biotechnol*, 8(8). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40694-021-00115-6>
- Ming-Kung, Y., & Yuan-Chuan, C. (2018). *Introductory Chapter: Biopharmaceuticals*. Rijeka: Intechopen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79194>
- Misra, M. (2012). *Biosimilars: Current perspectives and future implications*. Indian journal of pharmacology. <https://doi.org/https://doi.org/10.4103/0253-7613.91859>
- Niazi, S., & Lokesh, S. (2021). Biopharmaceutical Manufacturing. *IOP-SCIENCE*, 1, 43. <https://iopscience.iop.org/book/mono/978-0-7503-3175-3/chapter/bk978-0-7503-3175-3ch1>
- O'Rourke, A., Beyhan, S., Choi, Y., Morales, P., Chan, A. P., Espinoza, J. L., . . . Nelson, K. E. (2020). Mechanism-of-action classification of antibiotics by global transcriptome profiling. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(3). <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AAC.01207-19>
- Ostos Ortíz, O. L., Rosas Arango, S. M., & González Devia, J. L. (2019). *Biotechnological applications of microorganisms*. NOVA. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n31/1794-2470-nova-17-31-129.pdf>
- Parra, M., Pérez, R., & Martínez¹, J. (2018). *Respuesta in vitro de Penicillium ulaiense a fungicidas poscosecha*. Murcia: Universidad Politécnica de Cartagena. <https://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/11107/8-rip.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Pasin, B. L., González Azón, C., & Garriga, A. M. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1). <https://doi.org/https://sites.google.com/site/1rvcta/v3-n1-2012/h8>
- Pham, J. V., Yilma, M. A., Feliz, A., Majid, M. T., Maffetone, N., Walker, J. R., . . . Yoon, Y. J. (2019). A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. *Frontiers*, 10(1).
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01404/full>
- Rader, R. A. (2008). *(Re)defining biopharmaceutical*. Nature Biotechnology.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nbt0708-743>
- Rebeca, D. S. (2015). *CaracCaracterización de nuevos reguladores de los genes de biosíntesis de penicilina en Penicillium chrysogenum*. León: Instituto de Biotecnología de León INBIOTEC.
https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/4734/tesis_525eab.PDF?sequence=1&isAllowed=y
- Riu, F., Ruda, A., Ibba, R., Sestito, S., Lupinu, I., Piras, S., . . . Carta, A. (2022). Antibiotics and Carbohydrate-Containing Drugs Targeting Bacterial Cell Envelopes: An Overview. *An overview. Pharmaceuticals*, 15(8), 942. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ph15080942>
- Robledo Buritica, J., Aguirre Alfonso, C. A., & Castaño Zapata, J. (2019). Guía ilustrada de enfermedades en postcosecha de frutas y verduras y sus agentes causantes en Colombia. *Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.*, 1(38).
https://www.researchgate.net/profile/Jacobo-Robledo-Buritica/publication/337720200_Guia_ilustrada_de_enfermedades_en_postcosecha_de_frutas_y_verduras_y_sus_agentes_causantes_en_Colombia/links/5de6c3bb4585159aa45f61d3/Guia-ilustrada-de-enfermedades-en-post
- Rodriguez Castillejos, K. F. (2018). *Interacción levadura-levadura y su efecto en el biocontrol de hongos fitopatógenos de cítricos*. Reynosa: Instituto Politécnico Nacional.

<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/30608/Interacci%C3%B3n%20levadura-levadura%20y%20su%20efecto%20en%20el%20biocontrol%20de%20hongos%20fitopat%C3%B3genos%20de%20c%C3%ADtricos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sandle, T. (2013). *Pharmaceutical Microbiology Glossary*. Look Inside.

<https://www.pharmamicroresources.com/2013/02/antibiotic-classification.html#:~:text=Classification%20of%20antibiotics%20on%20the%20basis%20of%20origin%3A,Chromobacter%20violaceum%3A%20Bacitracin>

Sandle, T. (2022). *Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control 1st Edición*. Woodhead Publishing. <https://doi.org/978-0-08-100044-1>

Sandoval Perez, A. L., & Chávez Vásquez, M. B. (2015). “Evaluación de la calidad de los medicamentos esenciales, con forma farmacéutica sólida, en el hospital nacional y centros de abastecimiento de la red de servicios de salud de huehuetenango, por medio de pruebas físicas, desintegración e identificación... Universidad de San Carlos de Guatemala. <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QF1386.pdf>

Sharma, A., Khamar, D., Cullen, S., Hayden, A., & Hughes, H. (2021). Innovative drying technologies for biopharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 609. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121115>

Soliz Santander, F. F., Pereyra, M. M., Diaz, M. A., Senia, Y. P., & Dib, J. R. (2020). *Nuevos agentes microbianos para el control del moho verde en cítricos*. Sociedad Argentina de Biología. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/180467>

Svahn, K. C. (2015). *Penicillium nalgiovense Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B*. BMC. <https://doi.org/10.1186/s40694-014-0011-x>

Truong, W. R., Hidayat, L., Bolaris, M. A., Nguyen, L., & Yamal, J. (2021). The antibiogram: key considerations for its development and utilization. *JAC-antimicrobial resistance*, 3(2). <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab060>

- Urbina Salazar, A. d. (2019). *Producción de quitinasas a partir de subproductos de la industria alimentaria: aplicación a los hongos comestibles y crustáceos*. Bioquímica y Biología Molecular. Sevilla: Universidad de Sevilla.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=235105>
- Vásquez Muñoz, D. N., & Vega Chicoma, B. A. (2019). *Efecto de los porcentajes de maíz (Zea mays) maca (Lepidium meyenii) y arándano (Vaccinium myrtillus) en la aceptabilidad de un suplemento alimenticio instantáneo*. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
<https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/5926/BC-4260%20VASQUEZ%20MU%c3%91OZ-VEGA%20CHICOMA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Velásquez, M. A., Álvarez, R. M., Tamayo, P. J., & Carvalho, C. P. (2014). Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium* sp. *Corpoica*, 15(1), 14.
<https://www.redalyc.org/pdf/4499/449944863001.pdf>
- Verhamme, I. M., Leonard, S. E., & Perkins, R. C. (2018). *Proteases: Pivot Points in Functional Proteomics*. *Functional Proteomics: Methods and Protocols*.
https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-8814-3_20
- Wong-Paz, J. E., Aguilar-Zárate, P., Veana, F., & Muñiz-Márquez, D. B. (2020). Impacto de las tecnologías de extracción verdes para la obtención de compuestos bioactivos de los residuos de frutos cítricos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.255>