

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
I Z T A C A L A



**ESTUDIO SOBRE LA FERMENTACION PARA LA PRODUCCION
DE GRISEOFULVINA EN CULTIVO SUMERGIDO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

DULCE MA. C. GONZALEZ PACHECO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Lo que caracteriza al hombre
de ciencia, no es la posesión
del conocimiento o verdades
irrefutables, sino la
investigación desinteresada
e incesante de la verdad.**

Karl Popper

**El más sincero agradecimiento a mi maestra,
Dra. Susana Seval, por sus conocimientos
por el mucho tiempo dedicado a mi trabajo
y sobre todo, por su afán por mi formación
profesional, reiterándole además mi admiración
por la fortaleza de su espíritu**

**Mi agradecimiento también al Dr. Sergio Sánchez
por las facilidades incondicionales brindadas
en su laboratorio.**

A mamá, base firme y ejemplo
de integridad, tenacidad, amor
y de mucho entusiasmo

... Imprescindera en mi vida

A papá, cuyos valores y principios
junto con su inteligencia y alegría
condujeron a este paso

parte esencial de mi

A mis hermanitos: Joel, Israel, Sandra y Omhar
porque comparten mis alegrías y mis tristezas

con el mas grande cariño

A Eiel Yereini
por su maravillosa existencia
y su comfortable sonrisa

A mis adorados tios y primos

A mi gran abuelito

A las * * * *

*Mirame a la otra orilla del mundo que olvidamos;
que no olvidamos nunca,
porque bajo la palida ceniza que lo cubre
se te quedo tu mano a mi mano enlazada
y el corazon dormido en juvenil espuma ...*

... a ellas

CONTENIDO

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCION	2
	1. Antecedentes	2
	2. Características e importancia de la griseofulvina	4
	3. Incidencia de las enfermedades producidas por dermatofitos	10
	4. Invasión al huésped y mecanismos de patogenia de hongos dermatofitos	12
	5. Modo de acción de la griseofulvina	15
	6. Microorganismos productores de griseofulvina	18
	7. Biosíntesis	20
	8. Medios de cultivo para la producción de griseofulvina	22
	9. Condiciones de fermentación para la biosíntesis de griseofulvina	30
III.	JUSTIFICACION	34
IV.	OBJETIVOS	36
V.	ESTRATEGIA	37
VI.	MATERIALES Y METODOS	39
VII.	RESULTADOS Y DISCUSION	43
	1. Selección de la cepa productora de griseofulvina	43
	2. Efecto del tipo de matraces sobre producción griseofulvina	49
	3. Variabilidad de la producción de griseofulvina	55

4. Efecto de la concentración de los ingredientes del medio sobre la producción de griseofulvina	59
5. Efecto de la oxigenación sobre la producción de griseofulvina	70
VIII. INTEGRACION DE LOS RESULTADOS	80
IX. CONCLUSIONES	83
X. RECOMENDACIONES	84
APENDICE 1 Cuantificación de griseofulvina por ensayo microbiológico	85
APENDICE 2 Cuantificación de griseofulvina por cromatografía líquida de alta resolución	96
XI. BIBLIOGRAFIA	104

RESUMEN

La griseofulvina es un antibiótico antifúngico utilizado principalmente contra infecciones dérmicas de humanos y animales. Los microorganismos que se utilizan para su producción pertenecen al género *Penicillium*.

A pesar de ser un antibiótico clínicamente importante dada la especificidad de su acción y que se produce comercialmente en varios países, la información referente al proceso fermentativo no se encuentra publicada en la literatura científica, por lo que no es de fácil acceso. De ahí surgió el interés de conocer la influencia de los factores ambientales que afectan su biosíntesis, aspecto que dió origen al presente estudio.

Utilizando una cepa de *Penicillium griseofulvum* NRRL 2150A, que fue seleccionada con base en el título de griseofulvina producido, la experimentación se realizó en un medio conteniendo glucosa, nitrato de sodio y sales minerales, todos ellos grado industrial.

La cuantificación de la griseofulvina se realizó por ensayo microbiológico utilizando una cepa de *Microsporium gypseum* como microorganismo prueba. Algunos de los resultados obtenidos fueron comprobados por una técnica en cromatografía líquida de alta resolución.

Los resultados obtenidos muestran que la fermentación se lleva a cabo muy lentamente. El crecimiento alcanza su máximo a los 12 días, tiempo en que se agota la fuente de carbono. La griseofulvina se detecta en el caldo aproximadamente a los 3 días y alcanza su máximo (90 ug/mL) a los 15 días de fermentación. La productividad del proceso se ve influida por el grado de oxigenación del cultivo. Cuando se emplean matraces con deflectores o se aumentan las velocidades de aeración y de agitación en fermentadores de 14 litros, se reduce el tiempo de fermentación y se incrementa el título de griseofulvina.

Por otra parte la concentración de los ingredientes en el medio también afecta el título de producción tanto volumétrica como específica, siendo la glucosa y el nitrato de sodio los ingredientes de mayor importancia.

INTRODUCCION

1. Antecedentes

La griseofulvina es un antibiótico antifúngico producido durante el metabolismo secundario de varias especies del género *Penicillium*. Oxford y colaboradores (1939), reportaron por primera vez su aislamiento a partir del micelio de *Penicillium griseofulvum*. Estos autores describieron algunas de sus propiedades generales y caracterizaron parcialmente su química.

En 1946, Brian y colaboradores aislaron a partir de diferentes muestras de suelo una cepa de *Penicillium janczewskii*, de cuyo micelio recuperaron un metabolito que producía anomalías en el hongo *Botrytis allii*, particularmente ramificaciones excesivas en sus tubos germinales, internudos cortos y enrollamientos poco comunes, razón por la que a esta sustancia le denominaron factor de enrollamiento (curling factor).

Grove y Mc Gowan en 1947, demostraron que este factor de enrollamiento era químicamente idéntico a la griseofulvina previamente descubierta por Oxford. Tiempo después, Brian y colaboradores (1949), afirmaron que la actividad biológica y su espectro antibiótico también eran idénticos.

La estructura química del antibiótico fue reportada por Grove y colaboradores en 1952, la cual se presenta en la Figura 1.

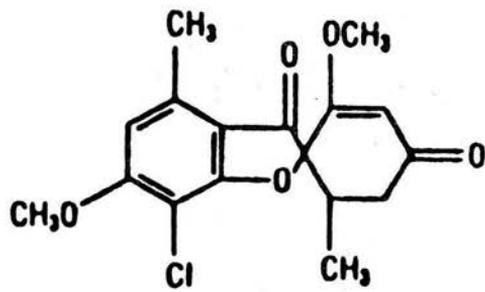


Fig. 1. Estructura química de la griseofulvina

2. Características e importancia de la griseofulvina

La griseofulvina es un polvo microcristalino de color blanco o cremoso, inodoro, insípido, neutro y químicamente estable. Es muy poco soluble en agua (0.001%; p/v) pero soluble en etanol, metanol (0.1%; p/v) y en dimetilformamida (12.0%; p/v). Tiene una rotación óptica de (+354 α°) y (-419 α°); no puede ser acetilado (Oxford y col., 1939). Presenta absorción máxima de luz ultravioleta a 324, 291, 252 y 236 nm. Es estable en estado seco por al menos dos años a una temperatura de 38°C (Grove y col., 1952).

En cultivos de superficie, con medios deficientes del ión cloruro y aún en medios normales, *Penicillium griseofulvum* y *Penicillium nigricans* produjeron el análogo de cloro de la griseofulvina a una concentración de 3-5 mg/L. Cuando se agregó bromuro de potasio al medio deficiente del ión cloruro se aislaron trazas (1-2 mg/L) del bromo-análogo de la griseofulvina (Mc Millan, 1954).

Por otra parte, se ha reportado que la griseofulvina se sintetiza completamente deuterada cuando *Penicillium griseofulvum* es cultivado en medios adicionados del óxido de deuterio, que es un compuesto radioactivo (Nona y col., 1968).

P. griseofulvum y *P. patulum* producen muchos metabolitos en común además de la griseofulvina, tales como ácido 6-metilsalicílico, ácido gentísico y patulina siendo este último un compuesto carcinógeno (Rhodes, 1963).

La griseofulvina inhibe el crecimiento micelial de varios hongos cuyas paredes celulares contienen quitina, pero no tiene efecto en bacterias, protoplastos de levaduras y hongos con paredes celulares que contienen celulosa, por lo que no se le considera un antibiótico de uso común (Brian y col., 1949).

En la Cuadro 1 se presentan algunos microorganismos cuyo crecimiento se ve afectado en presencia de griseofulvina (Huber, 1974).

Degos y colaboradores (1959), reportaron que la dosis de griseofulvina debe ser administrada oralmente para el tratamiento de infecciones dermatofíticas. Así, cobayos infectados con *Microsporium canis* fueron curados con una dosis oral de 60 mg de griseofulvina por cada kilogramo de peso.

A partir de esa publicación, varios grupos de investigadores empezaron a administrar griseofulvina a humanos que presentaban infecciones dermatofíticas, reportando el éxito en el tratamiento con el nuevo antimicótico (Roth, 1960).

Actualmente la griseofulvina es ampliamente usada como el antibiótico antifúngico de elección para el tratamiento de infecciones dermatofíticas crónicas en humanos y animales. Ejemplos de tales infecciones son aquellas que se desarrollan principalmente en el cuero cabelludo, las uñas, la ingle y las áreas interdigitales de los pies (Howard, 1983). En la Cuadro 2 se presentan las características clínicas de este tipo de infecciones causadas por hongos.

CUADRO 1
SENSIBILIDAD DE ALGUNOS ORGANISMOS A LA GRISEOFULVINA

ORGANISMO	GRISEOFULVINA (ug/mL)	% DE INHIBICION
<i>Alternaria tenius</i>	10	39 (a)
<i>Glomerella cingulata</i>	10	65 (a)
<i>Microsporium gypseum</i>	5	97 (a)
<i>Trichophyton interdigitalis</i>	10	95 (a)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	5	95 (a)
<i>Armillaria mellea</i>	1	50 (b)
<i>Botrytis allii</i>	1	50 (b)
<i>Diaporthe perniciosa</i>	1	50 (b)
<i>Phoma betae</i>	1	50 (b)
<i>Botrytis cinerea</i>	20	90 (a)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	--	(ins)
<i>Candida albicans</i>	--	(ins)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	--	(ins)

(a) Basado en peso seco; (b) Basado en crecimiento radial por ensayo microbiológico en placas con medio sólido; (ins) insensible a la griseofulvina (Huber, 1974).

CUADRO 2

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LAS PRINCIPALES INFECCIONES DERMATOFITICAS

TIPO DE INFECCION	LOCALIZACION	CARACTERISTICAS DE LAS LESIONES
Tiña corporal	piel no pilosa, lisa	parches circulares con bordes rojos vesiculosos crecientes y descamación central, prurito
Tiña de los pies (pie de atleta)	espacios interdigitales de los pies	prurito, piel roja vesiculosa en la fase aguda; escamas y fisuras en la fase crónica
Tiña crural	ingle	escamas eritematosas en zona intertriginosa, prurito
Tiña cefálica	cabello (endotrix, hongo dentro de diáfisis pilosa; ectotrix, hongo sobre la superficie del cabello)	parches circulares de calvicie, con cabellos cortos ó rotos dentro de los folículos pilosos; querión raro, los cabellos infectados con <i>Microsporum</i> dan fluorescencia
Onicomycosis	uñas	uñas gruesas o desmenuzadas distalmente cambio de color, sin lustre; por lo general asociada con la tiña de los pies

Actualmente se han identificado 40 especies de hongos infecciosos que son patógenos al hombre, los cuales pertenecen a tres generos: *Trichophyton*, *Microsporium* y *Epidermophyton*, de las cuales 11 especies están implicadas en infecciones humanas (Hashimoto, 1991). Según su adaptación estos hongos pueden ser geófilos (cuando el suelo es el hábitat natural), zoófilos (cuando una variedad de animales actúan como huésped natural) y antropófilos (cuando el hombre es el huésped natural) (Blumer y Fromtling, 1983).

En la Cuadro 3 se enlistan los organismos causantes de las principales infecciones dermatofíticas en humanos.

Existen otras infecciones que también pueden ser tratadas con la griseofulvina. Un ejemplo es la curación de la esporotricosis, infección cutánea producida por *Sporothrichum schenckii* localizada en la piel de los brazos, la cual se ha tratado experimentalmente por médicos mexicanos obteniendo resultados exitosos (González-Ochoa, 1960).

La griseofulvina es actualmente recomendada para el tratamiento de infecciones en humanos de acuerdo al Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud en México (1988). La administración oral de la griseofulvina por periodos prolongados ha mostrado tener una toxicidad remarcablemente baja, no hay reportes de manifestaciones tóxicas significantes. En algunos pacientes se han detectado reacciones secundarias como diarrea, cefalea, náusea, leucopenia y erupciones cutáneas. No se han reportado anormalidades en la función hepática, renal o de la química sanguínea. En ratas se demostró que el antibiótico no es un agente carcinógeno (Huber, 1974).

En cultivo de tejidos, se ha encontrado que la griseofulvina en concentraciones de 100 ug/mL inhibe el crecimiento de células HeLa y

CUADRO 3

MICROORGANISMOS CAUSANTES DE LAS PRINCIPALES INFECCIONES
DERMATOFITICAS EN HUMANOS

INFECCION	AGENTE CAUSANTE
Tiña de la cabeza	<i>Microsporum canis</i> <i>Trichophyton tonsurans</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i>
Tiña del cuerpo	<i>Microsporum canis</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton tonsurans</i> <i>Trichophyton concentricum</i> <i>Epidermophyton floccosum</i>
Tiña crural	<i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Epidermophyton floccosum</i>
Tiña de los pies	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Epidermophyton floccosum</i>
Tiña de las uñas	<i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Epidermophyton floccosum</i>

de líneas celulares de piel humana. A una concentración de 1 mg/mL, causa la destrucción completa de dichas células. También se ha reportado que el antibiótico causa gemación del amnión del feto humano y de las células del riñón del mono. En relación a otros sistemas animales, la griseofulvina causa inhibición de la espermatogénesis en ratones y necrosis del epitelio seminífero en ratas (Huber, 1974).

En la agricultura se ha reportado que la griseofulvina inhibe la germinación de semillas y el crecimiento de la raíz de ciertas plantas. Por ejemplo, inhibe el crecimiento de la raíz de la semilla de mostaza y lo retarda en las semillas de trigo y trébol, sin que la germinación de éstas se afecte (Brian y col., 1949).

Cuando la lechuga y la avena se expusieron a este antimicótico, se inhibió el desarrollo de las raíces y del tallo (Huber, 1974). No obstante, la griseofulvina también ha sido ampliamente usada para el control y tratamiento de infecciones por *Botrytis* en la lechuga y de *Alternaria* en el tomate (Roth, 1960).

3. Incidencia de las enfermedades producidas por dermatofitos

Las enfermedades micóticas del hombre se observan en el mundo entero, tanto en climas cálidos como en fríos. Sin embargo, es en las regiones cálidas y húmedas donde se reúnen las condiciones que son más favorables para la proliferación de hongos que son patógenos o saprófitos a plantas, animales y al hombre. Las dermatofitosis están entre las infecciones micóticas más prevalentes en el mundo (Blumer y Fromtling, 1963). En México, las enfermedades infecciosas de la piel también están situadas entre los primeros lugares, aunque las estadísticas respecto a las posiciones que ocupan los diferentes tipos de tífias en la población han variado a lo largo

del tiempo. Por ejemplo, en la década de los sesentas la tiña de la cabeza ocupaba el primer lugar, en los años 70 y 80's la tiña de los pies ocupó el primer sitio (Arenas, 1982).

Una de las características que distingue a las dermatofitosis de las demás infecciones micóticas es el contagio natural de la enfermedad, la infección es transmitida de persona a persona directamente por contacto o indirectamente vía fomites contaminados con escamas de cabellos o uñas. También se adquiere por contacto con animales infectados o por exposición directa al suelo infestado por dermatofitos (Hashimoto, 1991).

Datos estadísticos reportados indican que en México, la tiña de la cabeza se observa principalmente en niños y ocasionalmente en mujeres adultas, la del cuerpo en cualquier edad y sexo, la tiña de la ingle y de los pies predomina en varones adultos y la de las uñas en adultos (Arenas, 1982).

Es de suma importancia mencionar que en los hospitales del Sector Salud se aprecia notablemente que la consulta dermatológica en general aumenta cada año (León, 1970). Las principales causas de este aumento son:

- a) los animales domésticos están en contacto directo con los humanos,
- b) el uso excesivo de corticoesteroides, que son productos que causan predisposición a infecciones por hongos,
- c) la práctica de deportes de moda como "jogging", "aerobics", artes marciales y otros que implican el uso frecuente de tenis provocando sudoración excesiva,
- d) el uso de ropa estrecha y de tela sintética,
- e) el estado socio económico y cultural, ya que la frecuencia y severidad de las dermatofitosis está íntimamente relacionada

con la forma de vida de los habitantes de una región; aquellos que viven en las zonas más marginadas donde la insalubridad prevalece, son los que padecen infecciones más severas (Arenas, 1982).

4. Invasión al huésped y mecanismos de patogenia de hongos dermatofitos

El parasitismo empieza por la germinación de una espora del hongo patógeno posada sobre el huésped, para lo cual el microorganismo requiere de una alta humedad. La espora también puede penetrar por pequeños orificios o abrasiones presentes en la piel, iniciándose la actividad parasítica inmediatamente (Hashimoto, 1991).

Los dermatofitos usualmente invaden y parasitan mecánica o enzimáticamente, sólo aquellas partes queratinizadas de la piel, uñas y cabello (Blumer y Fromtling, 1983).

La relación huésped-parásito altamente desarrollada es la responsable de muchas manifestaciones clínicas, por ejemplo el rompimiento del cabello y la destrucción de uñas, que van acompañadas de reacciones inflamatorias y eczematosas. De los hongos patógenos, cada género muestra preferencia por infectar tejidos específicos, por ejemplo, *Microsporum* infecta el cabello y la piel, *Epidermophyton* infecta piel y uñas y *Trichophyton* atacan pelo, piel y uñas (Blumer y Fromtling, 1983). La desaparición espontánea de las lesiones es común, los síntomas clínicos desaparecen sin tratamiento alguno, sin embargo el hongo puede sobrevivir en el sitio infectado durante varios años, convirtiéndose así en un portador. La exposición de la lesión a un trauma o a un medio húmedo-cálido, puede estimular la reaparición de

la infección (Hashimoto, 1991).

La reacción inicial del huésped a la infección incluye la infiltración de neutrófilos y la formación de un edema epidermal, probablemente como una respuesta a los componentes quimotácticos de las células dermatofíticas. Al inicio de la infección se incrementa la proliferación epidermal como defensa del huésped contra los dermatofitos (Hashimoto, 1991).

Al establecerse el dermatofito, el curso de la infección se ve influenciado por otros factores del huésped, tales como el estado inmunológico, la exposición previa al hongo o la predisposición genética inherente (Hashimoto, 1991). Muchas de estas interacciones huésped-parásito son dependientes del medio y de las enzimas extracelulares hidrolíticas producidas por los dermatofitos como proteasas, lipasas, fosfatasas, nucleasas y glucosidasas (Blumer y Fromtling, 1983). De estas enzimas, las proteolíticas (queratinasa, colagenasa y elastasa) son las más frecuentemente implicadas en la patogénesis. Algunas de estas pueden actuar, ya sea facilitando la penetración de los tubos germinales o hifas del hongo en la queratina de los tejidos epidermales, asegurando los nutrimentos para el crecimiento fungico o bien produciendo una respuesta inmune inflamatoria local (Hashimoto, 1991).

Se ha reportado que una cepa de *Microsporum gypseum* y algunas especies de *Trichophyton* producen una enzima elastasa que les permite degradar la elastina, componente del tejido humano. Adicionalmente, *Trichophyton schoenleinii* produce enzimas capaces de solubilizar las tres escleroproteínas: queratina, elastina y colágeno.

Otros estudios también demostraron la existencia de actividad proteolítica sobre la queratina y la presencia de sus productos de degradación en una cepa de *Microsporum gypseum*. Al respecto, se han observado tres fases de degradación: la inicial caracterizada por un rápido crecimiento e incremento en la actividad proteolítica; la fase media, caracterizada por una disminución de las actividades de la fase inicial y la fase final, definida por un nuevo incremento en la descomposición del sustrato pero con reducción continua del crecimiento y de la actividad. Los principales productos de la queratinólisis son péptidos sencillos (Blumer y Flomting, 1983).

También se ha reportado que una cepa de *T. rubrum* secretaba lipasa y fosfolipasa A. Esta fosfolipasa parece jugar un papel importante en la función de la membrana celular y así ayudar al dermatofito a la invasión de las células huésped (Blumer y Fromting, 1983).

La barrera principal para una infección fúngica en humanos son las superficies epiteliales, esta penetración es necesaria para el siguiente estado patológico. Si bien el grado al cual el hongo puede penetrar el epitelio ejerciendo solamente presión mecánica en la célula huésped ha sido poco estudiado, se ha observado que el micelio del hongo penetra en la capa córnea, favorecido por la presencia de una escoriación, así el micelio avanza y se reproduce dicotómicamente (Odds, 1991). El huésped reacciona a la penetración del hongo generalmente por la formación de vesículas en los sitios de contacto entre los filamentos del micelio y la piel sana, apareciendo una lesión dermatofítica rodeada por una corona de vesículas o escamas periféricas llamada "ring worm". La lesión se extiende excéntricamente con la aparición de nuevas vesículas mientras que del centro se liberan filamentos activos que tienden a avanzar (Arenas, 1982).

El pelo sólo es atacado secundariamente, si uno de los filamentos encuentra un orificio piloso, éste continua por la capa córnea de la epidermis y se filtra hasta el infundíbulo, ahí el parásito encuentra otra fuente de queratina, el cabello. La progresión del hongo se detiene donde no hay queratina, al nivel del cuello del bulbo piloso (Arenas, 1982).

En experimentos *in vitro* se observó que el micelio del hongo invasor tenía forma de ramificaciones bifurcadas y aplastadas, las cuales se empujaban entre sí bajo las escamas cuticulares. Otros estudios, revelaron que la hifa del hongo dermatofítico digiere primero la región endocuticular menos resistente del cabello; posteriormente la capa exocuticular dejando intacta la resistente epicutícula del cabello (tomado de Blumer y Frontling, 1983).

5. Modo de acción de la griseofulvina

Administrada por vía oral, el antimicótico aparece en el estrato córneo de 4 a 8 horas después de su administración. La griseofulvina se difunde y se incorpora a las células queratinizadas (Medoff y Kobayashi, 1983).

El grado de absorción de la griseofulvina en el tracto gastrointestinal varía dependiendo del tamaño de la partícula del medicamento, del consumo de grasas y lípidos, de la tasa de disolución en los fluidos intestinales y del régimen de la dosis (Medoff y Kobayashi, 1983).

El mecanismo exacto mediante el cual este antibiótico produce su efecto contra los dermatofitos es aún desconocido, sin embargo, Gull y

Trinci (1973) reportaron que al agregar griseofulvina al medio de crecimiento del microorganismo de prueba (*Basidiobolus ranarum*) se produjo una multinucleación en las hifas fungales donde cada núcleo estaba físicamente separado uno de otro. También se observó que la tasa de crecimiento radial de las colonias de *B. ranarum* estaba inversamente relacionada al logaritmo de la concentración de griseofulvina en el medio.

El-Nakeeb y colaboradores (1965), demostraron que la absorción de la griseofulvina por *M. gypseum* involucra un proceso de dos etapas, de manera similar a lo observado en plantas donde la griseofulvina es absorbida y translocada sin alteración. En la primera etapa el hongo absorbe pequeñas cantidades de la griseofulvina adicionada al medio, lo cual probablemente se facilita por los lípidos que constituyen la membrana celular. La segunda fase, de penetración, es prolongada y requiere una fuente de energía. En otros estudios, Brian y colaboradores (1949) encontraron que la griseofulvina no tiene efecto sobre la respiración de *T. rubrum*.

Por otra parte, se ha reportado que la griseofulvina afecta los microtúbulos de las células animales. Se ha observado que después de inyectar griseofulvina a ratas, la mitosis se detiene en las células de la médula ósea y del epitelio intestinal, principalmente durante la metafase. También se observó que la griseofulvina causa desorientación del huso, dispersión de los cromosomas e inhibe el movimiento de los cromosomas hacia la anafase (Tomado de Medoff y Kobayashi, 1983).

A nivel molecular, la griseofulvina difiere de otros antimitóticos como la colchicina ya que se une a los receptores en la tubulina e inactiva las subunidades libres. Lo que hace evidente esto, es que la

griseofulvina no interfiere con la polimerización de la tubulina *in vitro* y que las células HeLa detenidas en la metafase muestran microtúbulos morfológicamente normales (Grisham y Wilson, 1973). En este caso la griseofulvina altera la función de los microtúbulos intactos en las células, más que causarles despolimerización (Medoff y Kobayashi, 1983).

Sin embargo, existen datos que muestran que la griseofulvina interfiere con la polimerización de la tubulina *in vitro* y que los efectos observados durante el ensamblamiento microtubular sí dependen de la concentración del antibiótico. A una concentración de 1×10^{-5} M de griseofulvina, las células 3T3 fueron detenidas en la metafase y presentaron microtúbulos normales pero cuando la concentración se aumentó a 5×10^{-5} M los microtúbulos citoplásmicos fueron destruidos (Medoff y Kobayashi, 1983).

Además de las propiedades antimitóticas y la acción *in vitro* contra la tubulina, la griseofulvina comparte otras propiedades con la colchicina y los vinca-alcaloides. Estudios *in vitro* realizados en cámaras Boyden, demostraron que a concentraciones de griseofulvina entre 0.1 a 1.0 $\mu\text{g/mL}$, se inhibe la quimotaxis de leucocitos polimorfonucleares de humano (Medoff y Kobayashi, 1983).

6. Microorganismos productores de griseofulvina

La griseofulvina fue aislada por vez primera del micelio de *Penicillium griseofulvum* (Oxford y col., 1939), pero también se ha reportado como un producto metabólico de otras especies. Se reportó la presencia de griseofulvina en caldos de fermentación de *P. viridi-cyclopium*, *P. brunneo-stoloniferum* y *P. nigricans* var. *sulfuratum*. Otras especies productoras de griseofulvina, con excepción de *P. brifeldianum* Dodge, pertenecen a dos grandes divisiones reconocidas del género *Penicillium*: *Asimetrica Fasciculata* y *Asimetrica Divaricata* (Tomado de Rhodes, 1963).

En la Cuadro 4 se enlistan los hongos productores de griseofulvina hasta ahora reportados. Muchas de las cepas que han sido usadas para la producción comercial de griseofulvina son mutantes de *P. patulum*.

Brian y colaboradores observaron que había grandes variaciones en la producción de griseofulvina utilizando diferentes cepas cultivadas en varios medios. Estos autores notaron que las cepas con conidios producían gran cantidad de griseofulvina, mientras que los cultivos que producían esclerocio sintetizaban cantidades muy pequeñas del antibiótico (Tomado de Huber y Tietz, 1984).

Una patente británica señala que obtuvo títulos de 11 mg/mL mediante una mutación de esporas de *P. urticae* con luz UV y sulfonato de etil metano. También se han obtenido mutantes de *P. nigricans* mediante tratamiento con urea nitrosometilo, radiación ultravioleta e isótopos de azufre. El uso de los primeros dos mutágenos dieron una producción de 3.6 mg/mL. Con el isótopo de azufre dió una producción de 3.5 mg/mL (Huber y Tietz, 1984).

CUADRO 4

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE GRISEOFULVINA

=====
Penicillium griseofulvum
Penicillium janczewskii
Penicillium nigricans
Penicillium urticae
Penicillium raistrickii
Penicillium albidum
Penicillium raciborskii
Penicillium melinii
Penicillium patulum
Aspergillus versicolor
Carpenteles brefeldianum
Khauskia oryzae
Nigrospora musae
Nigrospora oryzae
Nigrospora saccharii
Nigrospora sphaerica
=====

Fuente: Huber y Tietz (1984)

7. Biosíntesis

La ruta completa para la biosíntesis de la griseofulvina no ha sido totalmente elucidada, lo conocido hasta ahora es el resultado de estudios realizados con diferentes cepas de hongos (Fig. 2). Birch y colaboradores (1958), demostraron que la estructura de carbono de los anillos de la molécula de griseofulvina tienen origen policétido, ya que surge de la unión de un hetacétido sencillo que a su vez se forma por la unión de 7 unidades de acetato. Este origen se confirmó mediante el estudio de la incorporación de acetato marcado con C^{14} , en la molécula de griseofulvina durante el cultivo de *Penicillium griseofulvum*.

Rhodes y Boothroyd (1961), detectaron la presencia de benzofenona griseofenonas A, B y C y de griseoxantona C, al detener a diferentes tiempos la producción de griseofulvina en un cultivo de *Penicillium patulum*. Con esto demostró que el primer producto aromático que se forma es la griseofenona C, la cual es convertida primero a griseofenona B y luego a griseofulvina, por lo que sólo las griseofenonas B y C son precursores de la griseofulvina (Fig.2).

Las griseofenonas B y C también pueden ser convertidas a griseofenona A pero la incorporación de A en la griseofulvina nunca se ha logrado, por lo que ésta es solamente un co-producto de la biosíntesis.

Rhodes y Boothroyd (1961) sugirieron que el estado final de la biosíntesis involucra la unión de la griseofenona B a un complejo multienzimático el cual lleva a cabo reacciones de oxidación, reducción y metilación de intermediarios enlazados a la proteína.

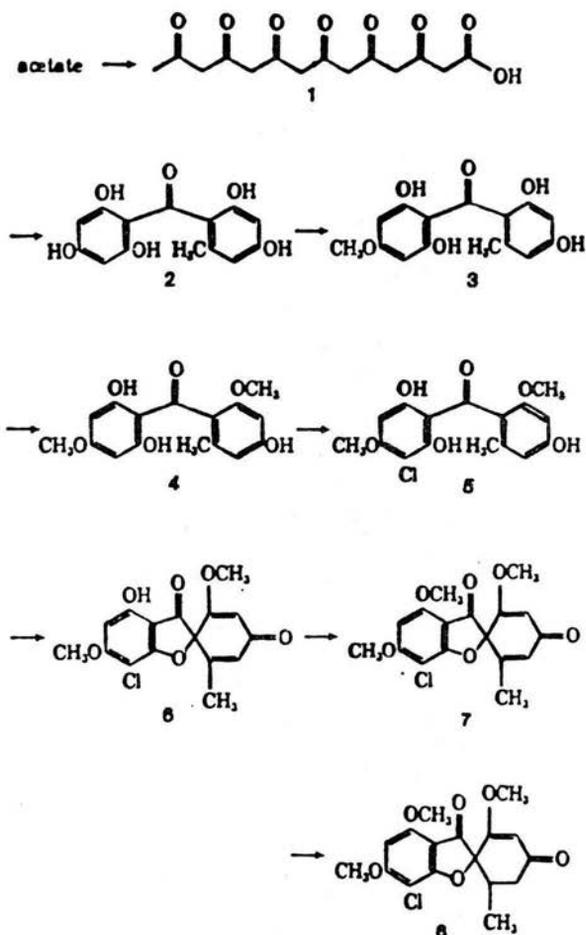


Fig. 2 Biosíntesis de la griseofulvina
 (Harris y col., 1976).

La introducción del cloro en estados tardíos de la biosíntesis es semejante a la biosíntesis de otros productos microbianos clorados (Turner, 1975). La declorogriseofulvina es un co-metabolito de la griseofulvina; se ha detectado en cultivos superficiales de *P. griseofulvum* y de algunas cepas de *P. janczewskii*. Sin embargo, en medios sin cloruros o en presencia de inhibidores de la cloración *P. patulum* acumula griseofenona C pero la declorogriseofulvina no se produce (Turner, 1975).

El tiempo en que ocurren las metilaciones y la cloración es de suma importancia. La cloración de la griseofenona C puede ocurrir en cualquiera de las dos posiciones del anillo A, pero el anillo B sólo se cierra si el carbono clorado es adyacente al carbono 7a (Sato y col., 1976).

En la Fig. 2 se muestra la secuencia de metilaciones reportada por Harris y colaboradores (1976). Una benzofenona monometilada (3) sufre una O-metilación para dar la griseofenona C (4), la cual es seguida de una cloración para dar la griseofenona B (5). En seguida ocurre una ciclización oxidativa de la griseofenona B para dar el grisan (6) el cual es seguido de una O-metilación adicional para dar la dehidrogriseofulvina (7) que finalmente al sufrir una reducción se convierte en griseofulvina (8).

8. Medios de cultivos para la producción de griseofulvina

Para la producción de griseofulvina se han reportado dos técnicas de fermentación. La primera técnica que se aplicó fue la de cultivo líquido en superficie y posteriormente fue cultivo sumergido.

Para el cultivo líquido en superficie se han utilizado los medios que se presentan en la Cuadro 5. Oxford y colaboradores (1939) y Hemming y colaboradores (1971) utilizaron un medio que contiene los mismos ingredientes del medio Czapek-Dox. El medio reportado por Huber y Tietz (1984), es similar pero adicionado de otras sales mineralres. Como se observa en la Cuadro 5, estos medios definidos contienen glucosa como fuente de carbono y una sal de nitrato como fuente de nitrógeno. En cambio, Brandl y colaboradores (1969) utilizaron un medio complejo conteniendo sacarosa como fuente de carbono y agua de cocimiento de maíz como fuente de nitrógeno.

Respecto al tiempo de incubación Oxford y colaboradores reportan de 65 a 85 días para la obtención de griseofulvina, mientras que Huber y Tietz (1984) indican que el término de la fermentación ocurrió a los 24 días. En ninguno de estos casos se menciona el título de griseofulvina obtenido. Hemming y colaboradores (1971) por su parte, encontraron que después de 14 días de cultivo, *Xhuskia oryzae* alcanzó un título de 130 mg/L.

Para la fermentación en superficie a gran escala Brandl y colaboradores (1969), diseñaron un reactor no convencional. El cultivo se lleva a cabo en discos apilados dentro del reactor. El aire húmedo se suministra de manera que el flujo de aire esté en dirección opuesta al crecimiento micelial. Después de 21-24 días de cultivo con *P. urticae* se obtuvo un título de producción de 7-10 g/L. De acuerdo a los autores, a pesar de que la producción máxima y la productividad en cultivo en superficie parecen ser más bajas con respecto a las obtenidas en fermentaciones sumergidas, los requerimientos de energía son fuertemente reducidos, por lo que su uso tiene gran interés.

CUADRO 5

PRODUCCION DE GRISEOFULVINA MEDIANTE CULTIVO LIQUIDO EN SUPERFICIE

CEPA	INGREDIENTES DEL MEDIO	REFERENCIA
<i>P. griseofulvum</i>	glucosa NaNO ₃ KH ₂ PO ₄ KCl MgSO ₄ FeSO ₄	Oxford y col., 1939
<i>P. urticae</i>	Sacarosa agua de cocimiento de maiz KCl NaSO ₄ KH ₂ PO ₄ CaCO ₃	Brandl y col., 1969
<i>Khuskia oryzae</i>	glucosa NaNO ₃ KH ₂ PO ₄ KCl MgSO ₄ FeSO ₄	Hemming y col., 1971
<i>P. janczwekii</i>	glucosa KNO ₃ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ FeSO ₄ CuSO ₄ ZnSO ₄ MnSO ₄ KMoO ₄	Huber y Tietz, 1984

En la Cuadros 6 y 7 se presentan los medios de cultivo empleados para la producción de griseofulvina en cultivo sumergido. La Cuadro 6 se refiere exclusivamente a estudios realizados a nivel matraz mientras que la Cuadro 7 reúne los trabajos llevados a cabo en fermentadores de gran escala.

Las fuentes de carbono comúnmente usadas a nivel de matraces son glucosa o lactosa; sin embargo, también ha sido reportado el uso de hidrocarburos (Laine y Magnoux, 1971).

Cuando los hidrocarburos se utilizaron para la producción de griseofulvina con *P. griseofulvum*, *P. patulum* o *P. nigricans*, la fermentación se llevó a cabo en dos etapas, en la primera se utilizaron levaduras, particularmente *Candida tropicalis* y *C. lipolytica* para iniciar el catabolismo de los alcanos. Posteriormente, los hidrocarburos parcialmente degradados fueron utilizados como fuente de carbono en la segunda etapa en la cual se inició la síntesis del antibiótico, obteniéndose producciones de 2.55 g/L después de 4 días.

Rhodes y Mc Gonagle (1963) utilizaron como fuente de nitrógeno agua de cocimiento de maíz (ACM), los autores afirman que este requerimiento puede ser parcialmente reemplazado por colina obteniéndose producciones más altas que al utilizar el medio original. También mencionan que otros componentes donadores de grupos metilo pueden ser beneficios para la fermentación. Otros autores prefieren el uso de fuentes de nitrógeno inorgánico como nitrato de sodio (Laine y Magnoux, 1971; Hemming y col., 1971), de amonio (Nordmman y col., 1968) o de potasio (Huber y Tietz, 1984). Respecto a la fuente de fosfatos, la mayoría de los autores reportan el uso de fosfato ácido de potasio.

CUADRO 6

PRODUCCION DE GRISEOFULVINA EN CULTIVO SUMERGIDO
A NIVEL DE MATRACES

CEPA	VOLUMEN DE TRABAJO (ml)	INGREDIENTES DEL MEDIO	TITULO (g/l)	REFERENCIA
<i>P. patulum</i>	60	ACM lactosa cal KH ₂ PO ₄ KCl colina	10.495	Rhodes y McGonagle, 1963
<i>P. urticae</i>	100	glucosa NH ₄ NO ₃ KH ₂ PO ₄ KCl CaCO ₃	9.05	Nordmman y col., 1968
<i>Khuskia oryzae</i>	200	glucosa NaNO ₃ KH ₂ PO ₄ KCl MgSO ₄ FeSO ₄	0.04	Hemming y col., 1971
<i>P. griseofulvum</i>	500	gasoleo NaNO ₃ KH ₂ PO ₄ KCl MgSO ₄ FeSO ₄ CuSO ₄ ZnSO ₄ MnSO ₄ KMoO ₄	2.55	Laine y Magnoux, 1971
<i>P. griseofulvum</i>	50	glucosa KNO ₃ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ FeSO ₄ CuSO ₄ ZnSO ₄	0.200	Huber y Tietz, 1984

CUADRO 7

PRODUCCION DE GRISEOFULVINA EN CULTIVO SUMERGIDO
EN FERMENTADORES DE GRAN ESCALA

CEPA	VOLUMEN DE TRABAJO (l)	INGREDIENTES DEL MEDIO	TITULO DE GRISEOFULVINA (g/l)	REFERENCIA
<i>P. patulum</i>	450	ACM lactosa cal KH ₂ PO ₄ KCl	1.5	Rhodes y col., 1958
<i>P. patulum</i>	3785	ACM (NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄ KCl CaCO ₃	14	Dorey y col., 1962
<i>P. patulum</i>	1514	ACM H ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄ KCl	8.5	Hockenhuil, 1962
<i>P. patulum</i>	3000	ACM cal KH ₂ PO ₄ KCl	15.4	Hockenhuil, 1962a

La presencia de cloruro de potasio se advierte en varios casos (Rhodes y Mc Gonagle, 1963; Nordman y col., 1968; Hemming y col., 1971; Laine y Magnoux, 1971), así como de elementos trazas entre los que destacan Mg^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} y Zn^{++} (Hemming y col., 1971; Laine y Magnoux, 1971; Huber y Tietz, 1984) adicionados como sales de sulfatos.

Los títulos de producción reportados en cultivo sumergido a nivel de matraces son muy variados, se reportan desde los 40 mg/L (Hemming y col., 1971) hasta 10.495 g/L (Rhodes y Mc Gonagle, 1963) pero también son diversas cepas las que se han utilizado.

Para las fermentaciones en cultivo sumergido a nivel de fermentadores (Cuadro 7) generalmente se reporta el uso de agua de cocimiento de maíz (ACM) no sólo como fuente de nitrógeno, sino se emplea también como fuente de carbono (Rhodes y col., 1957; Dorey y col., 1962; Hockenhull, 1962, 1962a).

Rhodes y colaboradores (1958), adicionaron lactosa, glucosa o desperdicios de otros procesos como melazas como fuentes de carbono; mencionan también que pueden utilizarse grasas pero se prefiere el uso de carbohidratos.

Hockenhull (1962a), introdujo un proceso utilizando un medio con una concentración limitada de carbohidratos, con el fin de tener control del pH durante la fermentación. La producción obtenida fue de 6 g/L después de casi 10 días de cultivo. Brandl y colaboradores (1969), utilizaron una solución de sacarosa muy concentrada como fuente de carbono, asegurando que altas cantidades de sacarosa agregada al inicio de la fermentación produce altas concentraciones del antibiótico.

La optimización de la producción parece estar significativamente relacionada al control del suministro de carbono. De ahí que el uso de lactosa en cultivos en lote sea probablemente un mecanismo que provee una liberación lenta de hexosas a través de una hidrólisis enzimática del disacárido. Este reemplazamiento de lactosa por glucosa, como se describe en varias patentes, da un control más directo sobre la velocidad de consumo de carbono. Estrategias de fermentación similares han sido ampliamente empleadas para fermentaciones industriales de penicilina (Huber y Tietz, 1984).

Cuando se utilizó agua de cocimiento de maíz como fuente de carbono y nitrógeno, al incrementar su concentración de 4 a 5 g/L, la producción del antibiótico aumentó de 8 a 9.4 g/L a las 220 horas (Hockenhull, 1982a).

Por otra parte, se mostró que el hecho de reemplazar parcialmente el agua de cocimiento de maíz por sulfato de amonio presentó ciertas ventajas, de esta forma Dorey y colaboradores (1982) obtuvieron una producción de 14 g/L en un volumen de 3785 litros. A este respecto, Rhodes y colaboradores (1957), también afirman que se obtienen mejores resultados cuando se mezclan dos o más diferentes fuentes de nitrógeno.

En todos los medios se reporta el uso de KH_2PO_4 como fuente de fosfato y sales como KCl y MgSO_4 principalmente. No todos los medios reportan el uso de elementos traza.

Los títulos de griseofulvina obtenidos por diferentes autores a nivel de fermentadores oscilan entre 1.5 g/L (Rhodes y col., 1957) y 15.4 g/L (Hockenhull, 1982a).

Para la preservación de los hongos productores de griseofulvina en medio sólido se han reportado dos formulaciones. Oxford y colaboradores (1939) y Rhodes y colaboradores, (1958) citan el uso del medio Czapeck-Dox mientras que el medio empleado por Huber y Tietz, (1984) contiene peptona, glicerol, melazas y sales minerales.

9. Condiciones de fermentación para la biosíntesis de griseofulvina

De acuerdo a la literatura, las condiciones de mayor influencia en la biosíntesis de griseofulvina son: el pH, la temperatura y la aeración. En la Cuadro 8 se describen las condiciones de pH y temperaturas utilizadas por algunos autores.

Hockenull (1962a), encontró que mediante el control del pH se logran aumentos en la producción de griseofulvina, siendo este parámetro sensible a la concentración de carbohidrato presente en el medio. El pH debe mantenerse preferentemente entre 6.8 y 7.2 al inicio de la fermentación, aquí debe tenerse en cuenta que la presencia de una gran cantidad de glucosa causará una disminución del pH. De la misma forma Dorey y colaboradores (1962) recomiendan un pH inicial menor a 6.6, por lo que el medio deberá tener bajas concentraciones de carbohidratos.

Otros autores como Hemming y colaboradores (1971) reportan un pH inicial de 5.6 y Nordman y colaboradores (1968), indican un pH inicial de 5.3.

Para Rhodes y colaboradores (1957) y Rhodes y Mc Gonagle (1963) el pH no es un parámetro crítico, pero preferentemente deberá ajustarse entre 4.5 y 5.5 antes de la fermentación, al

CUADRO 8

CONDICIONES DE pH Y TEMPERATURA PARA LA FERMENTACION DE GRISEOFULVINA

CEPA	pH	TEMPERATURA (°C)	REFERENCIA
<i>P. patulum</i>	4.5-5.5 (i)	25	Rhodes y col., 1957
<i>P. patulum</i>	6.6 (i)	25	Dorey y col., 1962
<i>P. patulum</i>	6.8-7.2 (c)		Hockenhull, 1962
<i>P. patulum</i>	4.5-5.5 (i)	25	Rhodes y McGonagle, 1963
<i>P. urticae</i>	5.3 (i)	24	Nordman, 1968
<i>K. oryzae</i>	5.5-6.5 (i)	24	Hemming y col., 1971
<i>P. griseofulvum</i>	4.5-5.0 (i)	26	Laine y Magnoux, 1971

(i) pH inicial de la fermentación
(c) pH controlado durante la fermentación

transcurrir el proceso el pH tiende a subir y al final llega a un valor entre 6.5 y 8. Laine y Magnoux (1971) reportan también un pH inicial entre 4.5 y 5.0.

Respecto a la temperatura, todas las fermentaciones se llevan a cabo en un intervalo entre 24 y 26°C.

El grado de aeración también es un factor de suma importancia en la fermentación de griseofulvina. Rhodes y colaboradores (1957), al realizar experimentos a nivel de matraces observaron que entre más alto fue el grado de agitación, mayor fue la producción de griseofulvina los autores señalan que existe una interacción entre el grado de oxigenación y el requerimiento de nitrógeno, de manera que cuanto más baja fue la oxigenación, el nivel de nitrógeno requerido fue menor. A nivel de fermentadores de gran escala (Cuadro 9), reportaron que durante el proceso debe aumentarse poco a poco el suministro de aire, así la fermentación se realizó a 0.82 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto (vvm) durante los primeros ocho días, posteriormente se incrementó a 1.25 vvm, manteniéndola en este valor hasta el final del tiempo de incubación, la velocidad de agitación permaneció constante a 350 rpm.

Dorey y colaboradores (1962), utilizaron una velocidad de agitación constante de 220 rpm y fueron incrementando la velocidad de aeración conforme transcurrió la fermentación de la siguiente manera: 0.29 vvm las primeras 5 horas, de 5 a 10 horas de incubación a 0.59 vvm y de las 10 horas en adelante a 0.93 vvm. El procedimiento empleado por Hockenhull (1962a) fue similar, él reportó que durante las primeras horas la velocidad de aeración fue de 0.46 vvm; de 5 a 10 horas fue 0.93 vvm y de las 10 horas hasta el término de la fermentación fue 1.49 vvm. El autor trabajó a una velocidad de agitación entre 160 y 165 rpm.

CUADRO 9

CONDICIONES DE OXIGENACION PARA LA PRODUCCION DE GRISEOFULVINA
EN FERMENTADORES DE GRAN ESCALA

CEPA	VELOCIDAD DE AGITACION (rpm)	TIEMPO DE FERMENTACION (h)	VELOCIDAD DE AERACION (vvm)	REFERENCIA
<i>P. urticae</i>	350	0 a 8 8 al final	0.62 1.25	Rhodes y col., 1957
<i>P. patulum</i>	220	0 a 5 5 a 10 10 al final	0.29 0.59 0.93	Dorey y col., 1962
<i>P. patulum</i>	160-165	0 a 5 5 a 10 10 al final	0.46 0.93 1.49	Hockenhu11., 1962

III. JUSTIFICACION

La obtención de compuestos quimoterapéuticos y bioactivos a partir de microorganismos es una de las ramas más importantes de la biotecnología. Entre los compuestos más importantes producidos vía fermentaciones industriales están los antibióticos, los agentes antitumorales, las vitaminas y las vacunas. De éstos, los antibióticos son los componentes que sobresalen desde los puntos de vista clínico y económico. A partir del descubrimiento de los primeros antibióticos se han descrito más de 5500 compuestos producidos por microorganismos, pero sólo cerca de 150 tienen aplicación en medicina, en veterinaria y en la agricultura como productos con actividades antibacteriana, antifúngica, plaguicida, antiviral o antitumoral.

Los antibióticos han sido estudiados más intensamente con un enfoque químico o bioquímico, comparado con los pocos ejemplos de procesos de fermentación que se han descrito como representativos en el campo. Dado que para algunos antibióticos, se ha logrado su producción industrial, el entendimiento de su química, su modo de acción, su biosíntesis y el conocimiento de los factores que la afectan es limitado y no siempre de fácil acceso.

En la literatura resaltan esencialmente dos aspectos, uno es que el número de antibióticos antifúngicos reportados hasta la fecha es mínimo comparado con los de acción antibacteriana; el otro aspecto es que muy pocos hongos, principalmente del género *Penicillium*, son productores de antibióticos. Teniendo este marco de referencia, la griseofulvina se convierte en un modelo interesante ya que es un antibiótico antifúngico que además es producido por un hongo.

La griseofulvina se produce comercialmente en varios países como Alemania, Austria, Hong Kong, Japón, Reino Unido, Suecia, Suiza y España, entre otros (SPP, 1988). Sin embargo, poca es la información en la literatura científica y aún en patentes, que puede reunirse para tener un panorama general sobre los aspectos más sobresalientes del proceso fermentativo.

La morfología micelial de los microorganismos productores de griseofulvina y algunos de los datos publicados, inducen a pensar que el proceso fermentativo puede ser sensible a la transferencia de oxígeno o a las condiciones hidrodinámicas que rigen el sistema de cultivo, de manera similar como sucede con la fermentación de penicilina.

Tomando como base estos antecedentes, surgió un proyecto de investigación encaminado a estudiar el proceso fermentativo para la producción de griseofulvina. Para la realización del presente trabajo, que es precisamente el inicio de dicho proyecto, se establecieron los objetivos que se presentan a continuación.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar estudios sobre la producción fermentativa de griseofulvina en cultivo sumergido.

Objetivos específicos

- 1) Realizar una compilación bibliográfica sobre los parámetros de fermentación que determinan la síntesis de la griseofulvina.
- 2) Establecer las condiciones experimentales para producir griseofulvina en cultivo sumergido, a partir de una cepa seleccionada previamente, utilizando un medio preparado con reactivos industriales y agua de la llave.
- 3) Evaluar el efecto de la concentración de los ingredientes del medio sobre la producción de griseofulvina.
- 4) Evaluar el efecto de la oxigenación sobre la producción de griseofulvina.

V. ESTRATEGIA

Para alcanzar los objetivos planteados se siguió la estrategia que se presenta en la Figura 3 en forma de diagrama. La experimentación se inició con la selección de la cepa productora de griseofulvina tomando como base el título producido en un medio conteniendo reactivos industriales y agua de la llave, sin pasar por alto el montaje de la técnica para la cuantificación del antibiótico.

Una vez seleccionada la cepa se evaluaron, a nivel de matraces, algunos factores que influyen la producción de griseofulvina como: el tipo de matraces y la concentración de ingredientes en el medio.

Posteriormente se llevó el proceso a fermentadores de 14 litros donde se evaluaron el efecto de la velocidad de agitación y el flujo de aire sobre la producción de griseofulvina.

Además del título de griseofulvina (ug/ml), se utilizaron otros parámetros como producción específica (ug/g células), productividad volumétrica (ug/ml x día) y productividad específica (ug/g células x día), con el fin de evaluar la eficiencia del proceso fermentativo.

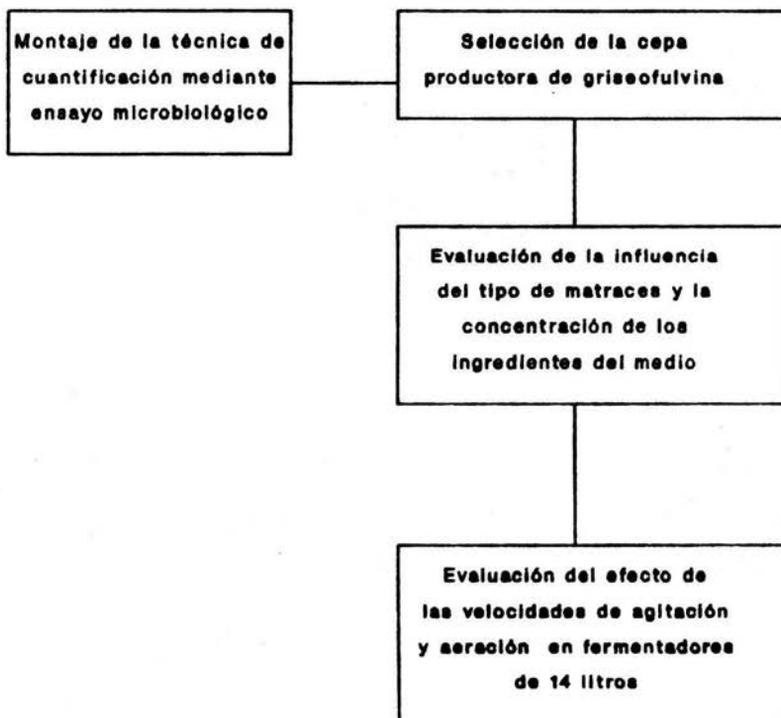


Fig.3 Estrategia seguida para el estudio del proceso de fermentación para producción de griseofulvina en cultivo sumergido.

VI. MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS ANALITICOS

Fenol, hidróxido de sodio, tartrato doble de sodio y potasio, metabisulfito de sodio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio y dimetilformamida fueron adquiridos de J.T. Baker de Mexico, S.A.

Acido 3,5-dinitrosalicílico de Aldrich Chemical Company, Inc., de Estados Unidos de Norteamérica.

Griseofulvina de Sigma Chemical Co. de Estados Unidos de Norteamérica.

Peptona, dextrosa y agar de Difco Laboratories de Estados Unidos de Norteamérica.

Agar de Sabouraud de Becton Dickinson de México, S.A. Agar de papa y dextrosa de E. Merck, Darmstadt, R.F.A.

REACTIVOS INDUSTRIALES

Cloruro de sodio, sulfato de magnesio, nitrato de sodio y fosfato dibásico de potasio se obtuvieron de la Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V., México.

Glucosa fue obsequiada por Arancia Comercial, S.A. de C.V., México.

MICROORGANISMOS

Para la selección del microorganismo productor de griseofulvina se probaron tres cepas: *Penicillium griseofulvum* NRRL 989 y NRRL 2150A y *Penicillium griseofulvina* NRRL 2300, las cuales fueron adquiridas a través de la Colección de Cultivos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN.

Para la cuantificación de griseofulvina por ensayo microbiológico se utilizó *Microsporium gypseum* ATCC 14683 como microorganismo de prueba.

MEDIOS DE CULTIVO

Medio de propagación de *Penicillium griseofulvum*

Agar de papa y dextrosa

Medio de propagación de *Microsporum gypseum*

Agar de Sabouraud

Medio para la producción de griseofulvina

Contenia: glucosa, 80 g; nitrato de sodio, 2.5 g; KH_2PO_4 , 1.0 g y MgSO_4 , 0.5 g; disueltos en 1000 mL de agua de la llave.

Medio para cuantificación de griseofulvina por ensayo microbiológico

Contenia: peptona, 10.0 g; dextrosa, 40.0 g y agar, 15.0 g, disueltos en 1000 mL de agua destilada.

Todos los medios fueron esterilizados durante 15 minutos a 121°C .

PREPARACION DE LA SUSPENSION DE ESPORAS

Las diferentes cepas productoras de griseofulvina se cultivaron en cajas Petri con medio de agar de papa y dextrosa a 25°C durante 10 días. Una vez crecidos los microorganismos se prepararon suspensiones de esporas en agua destilada estéril hasta tener una densidad óptica de 0.5 leída a 580 nm en un colorímetro Spectronic 20 (Baush & Lomb). Para inocular se emplearon 1.0 mL de esta suspensión por cada 100 mL de medio.

PRODUCCION DE GRISEOFULVINA EN MATRACES

Los matraces con medio de producción se inocularon con esporas de las diferentes cepas productoras de griseofulvina y se incubaron a 29°C en un agitador rotatorio (New Brunswick Scientific, Co.) con una velocidad de agitación de 160 rpm durante 12 días.

Durante la fermentación, diariamente se tomaron muestras en forma aseptica, se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos en una centrífuga clínica. En el sobrenadante se midió el pH y se determinaron griseofulvina y glucosa residual. El precipitado sirvió para determinar el crecimiento celular.

PRODUCCION DE GRISEOFULVINA EN FERMENTADORES DE 14 LITROS

Los experimentos se llevaron a cabo en un módulo para tres fermentadores de 14 litros (Labroferm, New Brunswick Scientific Co.) a una temperatura de 29°C. Los fermentadores estaban equipados con 3 impulsores tipo turbina y un difusor de anillo. El volumen del medio fue de 10 litros, lo que corresponde al 70% de la capacidad de cada fermentador. El aire, previamente filtrado a través de lana de vidrio, se suministró a una presión de 2 Kg/cm². Las condiciones de agitación y aeración empleadas se indican en el texto.

Durante las corridas de fermentación se tomaron muestras para determinar pH, griseofulvina, crecimiento celular y glucosa residual.

DETERMINACION DEL CRECIMIENTO CELULAR

Los precipitados obtenidos después de la centrifugación de cada muestra se resuspendieron en una solución de cloruro de sodio al 0.85% hasta su volumen original. Las muestras se filtraron con ayuda de vacío, sobre discos de papel filtro previamente puestos a peso constante. Los discos con la masa celular se secaron en una estufa a 40°C durante 24 hrs. Después de este tiempo se pesaron nuevamente para obtener por diferencia el peso correspondiente a la masa celular.

DETERMINACION DE GLUCOSA RESIDUAL

A una alícuota de 0.1 mL del sobrenadante de cada muestra se le adicionaron 1.9 mL de agua destilada y 3.0 mL del reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). De acuerdo con Miller (1959), se llevó a ebullición en baño María durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se adicionaron 15 mL de agua destilada para obtener 20 mL de volumen final. Después de homogeneizarlas se leyó la densidad óptica a 550 nm en colorímetro Spectronic 20 (Baush & Lomb). La concentración de glucosa se calculó a partir de la curva de calibración que se presenta en la Figura 4.

El reactivo de DNS contenía: hidróxido de sodio, 1.4%; ácido 3,5-dinitrosalicílico, 0.75%; tartrato doble de sodio y potasio, 21.6%; fenol, 0.58% y metabisulfito de sodio, 0.59%. Los componentes se adicionaron en ese orden, permitiendo una disolución completa cada vez, se aforsó al volumen correspondiente y se guardó en un frasco color ambar.

DETERMINACION DE GRISEOFULVINA

Los detalles del montaje de la técnica microbiológica y el tratamiento de las muestras se presentan en el Apéndice 1.

Cuando fue necesario se hicieron determinaciones de griseofulvina por cromatografía líquida de alta resolución. Los detalles de esta técnica se presentan en el Apéndice 2.

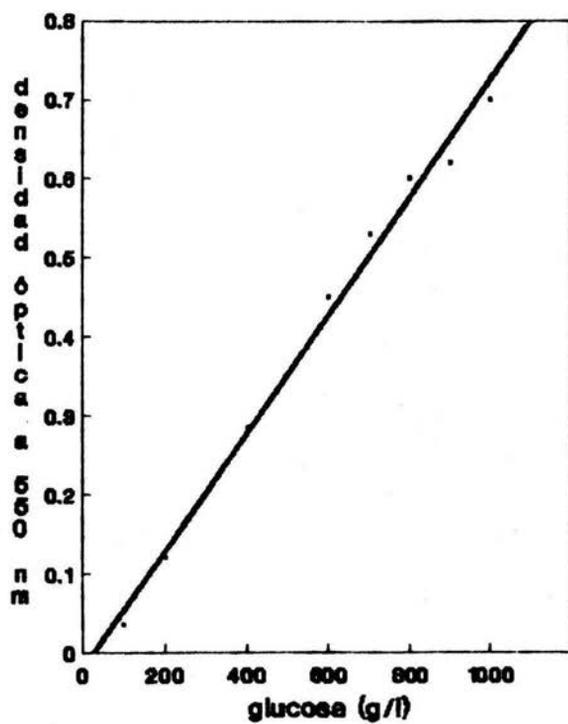


Fig. 4 Curva de calibración para la determinación de glucosa residual

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

Uno de los aspectos importantes para establecer las condiciones que permitan la producción de cualquier metabolito por vía fermentativa, es la formulación del medio de cultivo. En el caso específico de este trabajo, se decidió utilizar un medio de cultivo preparado con reactivos industriales y agua de la llave desde el inicio, en virtud de que a futuro, se llevarán a cabo estudios a nivel de planta piloto, escala en la que el costo del medio es un factor de suma importancia que no debe ser pasado por alto.

Tomando como base las formulaciones reportadas por Huber y Tietz (1984), que fue la única fuente de información disponible al iniciar el trabajo, se decidió incluir en la formulación pocos ingredientes, que estuvieran fácilmente disponibles en el mercado nacional y que además su costo fuera el más bajo posible. La formulación establecida mostrada en la Cuadro 10, reúne los ingredientes que de acuerdo a la literatura son requeridos para la síntesis de griseofulvina. No se consideró necesaria la adición de elementos traza, debido a que se utilizó agua de la llave.

1. Selección de la cepa productora de griseofulvina

Las cepas *Penicillium griseofulvum* NRRL 989 y NRRL 2150A y *Penicillium griseofulvina* NRRL 2300, fueron cultivadas en el medio citado en la Cuadro 10, para seleccionar aquella que presentara los más altos títulos de producción y productividad volumétricas. La incubación se hizo en matraces Erlenmeyer, agitados durante 12 días, tomando muestras cada día.

CUADRO 10

MEDIO DE CULTIVO EMPLEADO PARA LA PRODUCCION
DE GRISOFULVINA EN FERMENTACION SUMERGIDA

INGREDIENTE	CONCENTRACION (g/L)
Glucosa anhidra	80.0
NaNO ₃	2.5
KH ₂ PO ₄	1.0
NaCl	0.5
MgSO ₄	0.5

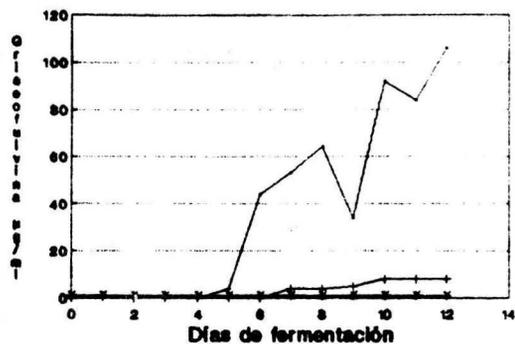
Los perfiles de las fermentaciones se presentan en la Figura 5. Como puede observarse el título de griseofulvina más alto, de 108 ug/mL, fue producido por la cepa *P. griseofulvum* NRRL 2150A; la cepa *P. griseofulvum* NRRL 989 produjo un título muy bajo, de sólo 8 ug/mL y con la cepa *P. griseofulvina* NRRL 2300 no se observó producción del antibiótico (Fig. 5A).

El crecimiento micelial (Fig. 5B) de la cepa NRRL 2150A fue menor en comparación con las otras dos cepas, aunque su evolución mostró un perfil similar. A partir del tercer día la cepa NRRL 989 presentó el mayor incremento en masa celular hasta el final de la fermentación. El crecimiento de la cepa NRRL 2300 se inició el tercer día pero fue aumentando poco a poco acercándose al perfil descrito por la cepa NRRL 989.

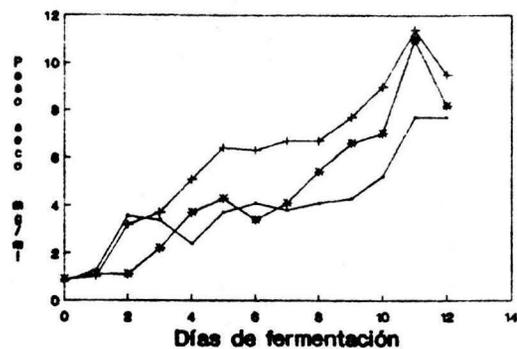
Respecto a la variación del pH durante la fermentación (Fig. 5 C) se observó con la cepa NRRL 2300 una disminución muy marcada en comparación con las otras dos cepas, a partir del día 4. Con las cepas NRRL 2150A y NRRL 989 el pH tendió a incrementarse el segundo día y posteriormente bajó, manteniéndose alrededor de 4 desde el día 6, momento en el cual se inició la producción de griseofulvina. Estos resultados podrían sugerir que el pH juega un papel importante en el metabolismo de estos hongos.

El consumo de glucosa durante la fermentación fue similar en las tres cepas, los primeros 5 días (Fig. 5D). Al final del tiempo de incubación se observó que la cepa NRRL 989 fue la que consumió la mayor cantidad, quedando un 10 % de glucosa en el medio. Con la cepa NRRL 2150A el consumo de glucosa entre los días 7 y 10 fué mínimo, quedando un 20 % al final. La cepa NRRL 2300 presentó un perfil de consumo de glucosa similar al de la cepa NRRL 2150A, pero con un consumo menor, de tal forma que al

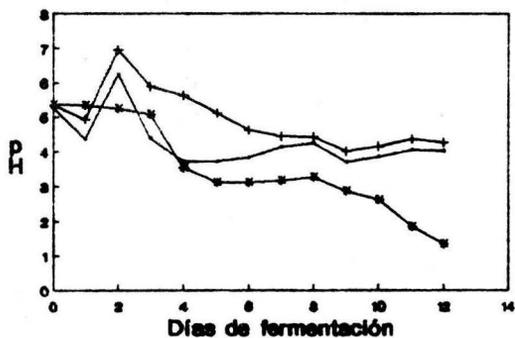
A. Título de griseofulvina



B. Crecimiento micelial



C. pH



D. Glucosa residual

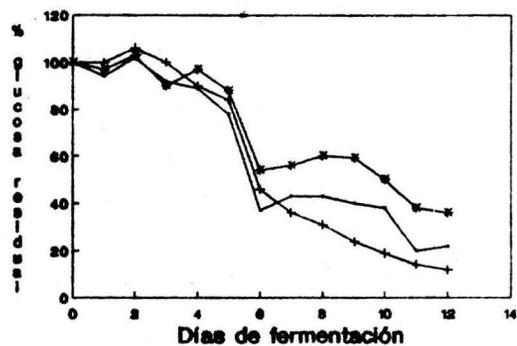


Fig. 5 Perfiles de las fermentaciones para la producción de griseofulvina, realizadas con 3 diferentes cepas en matraces agitados a 29 °C y 180 rpm. (---) *Penicillium griseofulvum* NRRL 2150A (---) *Penicillium griseofulvum* NRRL 989 (---) *Penicillium griseofulvum* NRRL 2300

final de la fermentación quedó un 40% de la glucosa inicial.

Con los datos obtenidos de estas fermentaciones, se calcularon los valores de productividad y producción específica que se presentan en la Cuadro 11. Dado que el título de griseofulvina obtenido con la cepa NRRL 2150A fue más alto que el alcanzado con la cepa NRRL 989, la productividad y producción específicas y la productividad volumétrica también fueron mayores, lo que sugiere que la cepa NRRL 2150A es la más eficiente para la producción de griseofulvina en el medio utilizado. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que en otro medio de cultivo, el comportamiento de las cepas sea diferente.

Con base en los resultados obtenidos se seleccionó la cepa de *Penicillium griseofulvum* NRRL 2150A para llevar a cabo el estudio utilizando el medio cuya formulación se presentó en la Cuadro 10.

CUADRO 11

COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS CEPAS PROBADAS *

	<i>P. griseofulvum</i> NRRL 989	<i>P. griseofulvum</i> NRRL 2150A	<i>P. griseofulvina</i> NRRL 2300
TITULO DE GRISEOFULVINA (ug/ml)	8.0	106.0	0
PRODUCCION ESPECIFICA (ug/ml)	0.88	13.76	0
PRODUCTIVIDAD VOLUMETRICA (ug/ml-h)	0.8	8.83	0
PRODUCTIVIDAD ESPECIFICA (ug/g-h)	0.088	1.14	0

* Las cepas fueron cultivadas en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio para producción de griseofulvina a 29°C y 180 rpm.

2. Efecto del tipo de matraces sobre la producción de griseofulvina

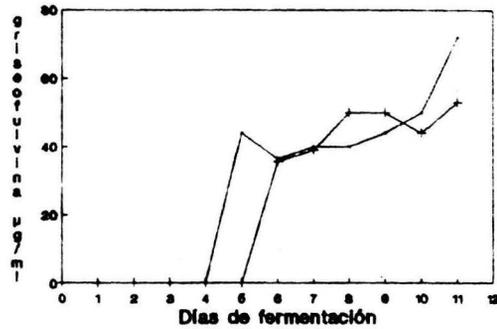
De acuerdo a la literatura se sabe que la producción de una gran mayoría de antibióticos se ve afectada por la concentración de oxígeno presente en el caldo de cultivo. Algunos ejemplos de estos antibióticos son penicilina (Niyiri y Lengyel, 1965; Mason y Righelato, 1976) estreptomycin (Bartholomew y col., 1950), gentamicina (Liefke, 1990), tetraciclina (Matelová y col., 1955), de los cuales el primero es producido por un hongo y los restantes por actinomicetos.

Por otro lado, Freedman (1969) encontró que los matraces con deflectores permiten una mayor oxigenación de los cultivos debido a la turbulencia que se genera por la presencia de los deflectores, situación que no ocurre en los matraces Erlenmeyer lisos.

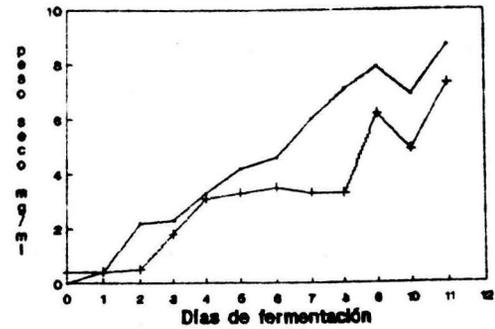
Con el fin de conocer si la oxigenación a nivel de matraces tiene efecto sobre la producción de griseofulvina, se llevaron a cabo experimentos utilizando matraces Erlenmeyer lisos y matraces Erlenmeyer con deflectores laterales. En ambos casos el volumen de los matraces fue de 500 mL con un volumen de medio de 200 mL, lo que dió una fracción de llenado de 0.4.

Como se observa en la Figura 6A el título de griseofulvina alcanzado a los 11 días de fermentación con los matraces con deflectores (72 ug/mL) fue mayor al obtenido con los matraces Erlenmeyer lisos (53 ug/mL). Además, en los matraces con deflectores se observó que la producción del metabolito tuvo inicio un día antes respecto a lo encontrado en matraces lisos.

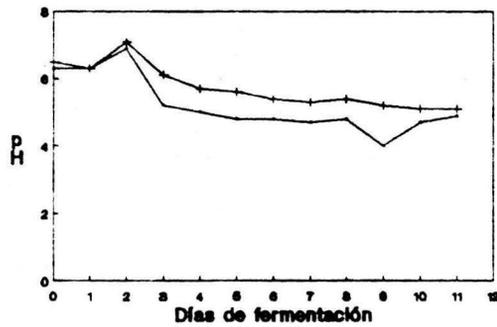
A. Título de griseofulvina



B. Crecimiento micelial



C. pH



D. Glucosa residual

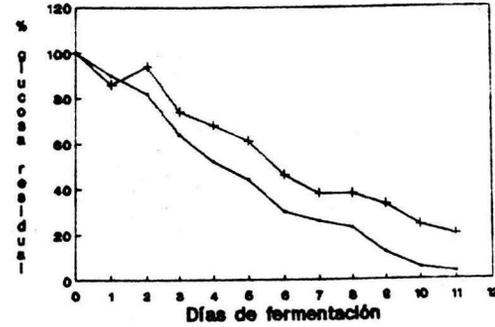


Fig. 6 Perfiles de las fermentaciones para la producción de griseofulvina obtenidos al cultivar *P. griseofulvum* NRRL 2150A en matraces Erlenmeyer de 250 ml con deflectores (—) y lisos (---) incubados a 29 °C y a 160 rpm.

Respecto al crecimiento micelial (Fig. 6B) en los matraces con deflectores se observó que a partir del segundo día se inició, mientras que en los matraces lisos fue hasta el tercer día cuando el crecimiento ocurrió. Durante la fermentación el crecimiento observado en los matraces con deflectores fue un poco mayor que en los matraces lisos, no obstante al final de los 11 días se alcanzaron valores cercanos.

El pH en ambos tipos de matraces mostró la misma tendencia durante la fermentación, pero los valores registrados en los matraces con deflectores, fue menor que en los otros a partir del tercer día (Fig. 6C).

Los perfiles de consumo de glucosa (Fig. 6D) fueron similares en ambos casos; sin embargo, en los matraces con deflectores, este consumo ocurrió de manera más rápida que en los matraces lisos, aparentemente el retraso fue de un día, lo que coincide con las observaciones hechas con los otros parámetros.

Como consecuencia de la reducción en el tiempo de fermentación, al emplear matraces con deflectores, la productividad volumétrica alcanzó un valor de 6.54 ug/mL-día, que comparado con lo obtenido en los matraces lisos, de 4.81 ug/mL-día corresponde a un incremento del 28.5 % (Cuadro 12). La productividad específica fue de 0.65 ug/g-día en los matraces lisos, mientras que en los matraces con deflectores fue de 1.33 ug/g-día, lo que representa un aumento del 104% respecto a los primeros (Cuadro 12). La producción específica obtenida al emplear los matraces con deflectores fue 14% mayor en relación a lo obtenido con los matraces lisos. Estos resultados sugieren que la oxigenación aumenta la eficiencia del hongo, orientando su metabolismo hacia la síntesis del antibiótico.

CUADRO 12

COMPARACION DE LA FERMENTACION DE GRISEOFULVINA EN
MATRACES ERLENMEYER LISOS Y CON DEFLECTORES

PARAMETRO	MATRACES ERLENMEYER	
	CON DEFLECTORES	LISOS
TITULO DE GRISEOFULVINA (ug/ml)	72	53
PRODUCCION ESPECIFICA (ug/g-cel)	8.27	7.26
PRODUCTIVIDAD VOLUMETRICA (ug/ml-dia)	6.54	4.81
PRODUCTIVIDAD ESPECIFICA (ug/g-dia)	1.33	0.65

Por otra parte, se observó que en los matraces lisos el crecimiento del hongo se presentó en forma de "pellets", en cambio, en los matraces con deflectores el hongo se desarrolló en forma filamentosa más dispersa, por lo que el medio se observó más viscoso. Adicionalmente en los matraces lisos se observó una acumulación muy pronunciada del micelio que formó una "costra" en las paredes de los matraces ocasionando heterogeneidad en el cultivo, a diferencia de esto, en los matraces con deflectores la "costra" prácticamente no se formó, lo que favoreció una mayor homogeneidad del cultivo; de esta manera, toda la masa celular tuvo mayor contacto con el sustrato. Esto se debe a la diferencia en el tipo de movimiento del cultivo dentro del matraz aún a la misma velocidad de agitación, que es consecuencia de la presencia de los deflectores.

Mitard y Riba (1987), han establecido que un mismo hongo puede desarrollar dos diferentes formas de crecimiento micelial: el filamentoso y en forma de "pellets", donde cada una presenta sus propias características respecto a su cinética de crecimiento, consumo de oxígeno y reología. Generalmente, un crecimiento filamentoso produce medios más viscosos, por lo que la agitación y la aeración se hacen más difíciles. Así, se ha afirmado que la forma de crecimiento tiene un efecto importante en el desarrollo y la formación del producto (Cooney, 1985).

Los resultados en este trabajo, coinciden con lo establecido anteriormente, ya que la fermentación en los matraces con deflectores donde se observó un crecimiento filamentoso, ocurrió de manera más rápida en comparación con lo observado en los matraces lisos. Esto podría sugerir que el

tipo de crecimiento también juega un papel importante en el éxito de la fermentación de *Penicillium griseofulvum*, tal como sucede en otros hongos como *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger*, donde se ha encontrado que los niveles de producción de penicilina y de ácido cítrico, respectivamente, dependen no sólo de los niveles de oxigenación, sino también del tipo de morfología que desarrolle el hongo (Calam y Smith, 1981; Righelato y col., 1968).

Si bien los resultados obtenidos reflejaron sólo una ligera mejora en el título de griseofulvina por efecto de la oxigenación, el efecto sobre la productividad sí fue sustancial, debido no sólo a las condiciones de oxigenación, sino también al efecto del mezclado sobre el desarrollo del hongo. Estos aspectos sirvieron como referencia, cuando el cultivo se realizó en fermentadores de 14 litros.

Con base en estos resultados se decidió utilizar matraces con deflectores en los siguientes experimentos.

3. Variabilidad en la producción

A pesar de que un gran número de procesos de fermentación muestran una marcada variación propia, existe muy poca información al respecto; sólo en pocas ocasiones se hace alguna mención a la variabilidad encontrada (Shultz y col., 1960).

Algunos autores hacen notar que las condiciones de trabajo tienen una fuerte influencia sobre tal variabilidad, por ejemplo, Bartholomew y colaboradores (1950), reportan que manteniendo constantes el flujo de aire y la agitación, el título de producción de estreptomocina al utilizar un difusor de acero sintetizado, fue muy variable de una fermentación a otra, pero estas variaciones se reducían al utilizar el difusor de un sólo orificio. Por otro lado también se reportó una reducción de la variabilidad en la producción de penicilina, cuando se implementó el control del pH en el proceso (Shultz y col., 1960).

Saval (1992), reporta también una variabilidad en la producción de estreptomocina como una característica intrínseca de todo sistema biológico, que debe ser evaluada para conocer su magnitud cuando todas las condiciones de trabajo permanecen constantes.

Al estar realizando el presente trabajo surgió precisamente la necesidad de conocer la variabilidad en el título de producción de griseofulvina obtenido con la cepa empleada, para asegurar si las diferencias en los títulos encontrados se deben al efecto de las variables del proceso o si se deben al error experimental asociado de manera natural al propio experimento.

Para evaluar esta variabilidad se corrieron tres fermentaciones bajo las mismas condiciones, pero llevadas a cabo en fechas diferentes utilizando el mismo lote de reactivos. Por las experiencias anteriores se decidió tomar muestras a partir del sexto día del período de incubación. Los títulos obtenidos reportados en la Figura 7 son promedio de 3 determinaciones microbiológicas de griseofulvina, como se puede observar, las fermentaciones 2 y 3 presentan perfiles muy semejantes durante la mayor parte de la fermentación; sin embargo la fermentación 1 presenta variaciones mayores.

En la Tabla 13 se muestran los promedios del título de griseofulvina obtenidos de cada día de la fermentación. Aunque presentan una tendencia a incrementarse al transcurrir el tiempo, el coeficiente de variabilidad es diferente para cada día, lo que indica la magnitud de la variación entre las repeticiones realizadas.

Entre algunas posibles razones por las que se tiene esta variación están: a) algunas dificultades en la filtración durante el proceso de recuperación del antibiótico, b) la cuantificación de griseofulvina utilizando un sistema biológico que tiene su propia variación (Roth, 1963), y c) la variabilidad intrínseca del proceso fermentativo.

Estos resultados sugieren que al evaluar el efecto de las variables no es conveniente comparar los títulos que provengan de diferentes experimentos, sino que deberán incluirse en un mismo experimento en el que preferentemente se hayan incluido repeticiones, con el fin de obtener resultados más confiables.

Título de la griseofulvina

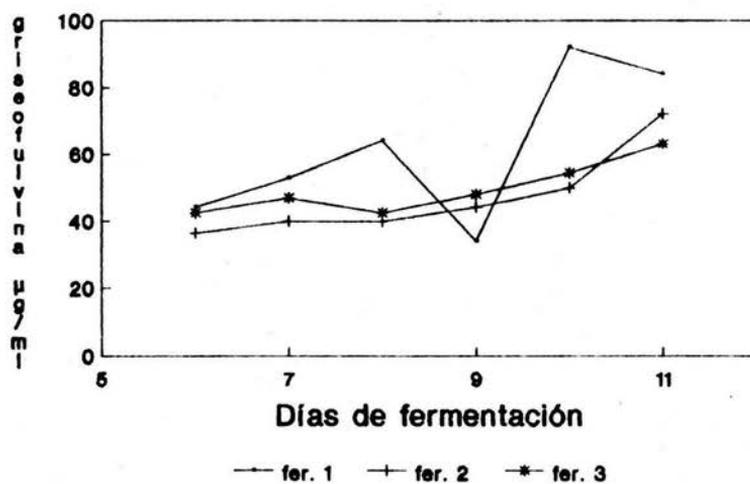


Fig. 7 Variabilidad en la producción de griseofulvina obtenida de tres fermentaciones realizadas en diferentes fechas.

CUADRO 13

VARIABILIDAD EN EL TITULO DE GRISOFULVINA OBTENIDO
DE DIFERENTES FERMENTACIONES

DIA DE FERMENTACION	TITULO DE GRISOFULVINA PROMEDIO (ug/ml)	DESVIACION ESTANDAR (ug/ml)	COEFICIENTE DE VARIABILIDAD (%)
6	40.93	+ 4.07	9.94
7	46.67	+ 6.51	13.95
8	48.80	+ 13.22	27.71
9	42.00	+ 7.21	17.17
10	65.47	+ 23.08	35.25
11	73.00	+ 10.54	14.44

4. Efecto de la concentración de los ingredientes del medio sobre la producción de griseofulvina

Los procesos microbianos son regulados por las actividades bioquímicas del microorganismo y por las condiciones de su microambiente, factores que están íntimamente relacionados. Sin embargo, son las condiciones ambientales las únicas que pueden ser controladas directamente y que a su vez definen la actividad metabólica de las células (Onken y Weiland, 1985).

Desde el punto de vista económico, un microorganismo con las mínimas exigencias nutricionales es deseable. Pero además, es conveniente conocer los mecanismos regulatorios que operan en las vías metabólicas involucradas para que la producción de un compuesto pueda ser incrementada a través de ajustes en las condiciones de cultivo. Si bien se han realizado estudios sobre los mecanismos regulatorios operantes en la biosíntesis de antibióticos, el desarrollo industrial se basa principalmente en aproximaciones (Aharonowitz, 1980). De hecho la composición de medios de cultivo industriales es inicialmente el resultado de ensayos empíricos dirigidos a garantizar la actividad metabólica del microorganismo (Cejka, 1985).

El objetivo del control de un proceso, por lo tanto, es crear el ambiente más favorable para un cultivo a fin de producir un óptimo de la actividad metabólica deseada, con el menor gasto de ingredientes en el medio.

Se sabe que la optimización para producción comercial de metabolitos es usualmente mantenida en secreto, por lo que la información encontrada en la literatura proviene generalmente de laboratorios universitarios de investigación (Onken y Weiland, 1985).

Dada la poca información publicada acerca del proceso fermentativo para la producción de griseofulvina y con el fin de identificar, de manera muy general, los principales ingredientes del medio que afectan su biosíntesis, se llevaron a cabo experimentos con 3 niveles de concentración para cada uno de los ingredientes, esto es, una concentración alta y una baja en relación a la concentración original como se indica en la Cuadro 14. Las pruebas se realizaron por duplicado.

Efecto de la concentración de glucosa

En la Figura 8 se observa que con una concentración de glucosa 80 g/L se obtuvo un título de griseofulvina (36.39 ug/mL) menor respecto al obtenido con 60 y 100 g/L, que fue de 51.5 y 43.14 ug/mL, respectivamente. Cabe mencionar que en experimentos previos a éste, se observó que a una concentración de 20 g/L no hubo producción de griseofulvina, sin embargo, si se apreció crecimiento celular.

En relación al crecimiento, se observó que a mayor concentración de glucosa se obtiene mayor peso micelial; los valores obtenidos a 60, 80 y 100 g/L de glucosa fueron 7.96, 12.8 y 19 g/L), respectivamente. Esto se reflejó en la producción específica, que fue mas alta cuando la concentración de glucosa fue de 60 g/L, alcanzando un valor de 5.46 ug/g de células.

Estos resultados podrían sugerir la presencia de mecanismos de represión en la vía biosintética de griseofulvina a concentraciones altas de glucosa (Martín y Demain, 1980).

CUADRO 14

CONCENTRACIONES PROBADAS PARA DE CADA UNO
DE LOS INGREDIENTES DEL MEDIO

INGREDIENTES	CONCENTRACION (g/L)		
	BAJA	ORIGINAL	ALTA
Glucosa	60	80	100
NaNO ₃	1.5	2.5	3.5
KH ₂ PO ₄	0.5	1.0	1.5
NaCl	0.0	0.5	1.0
MgSO ₄	0.0	0.5	1.0

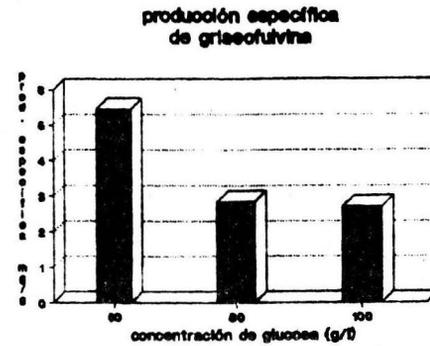
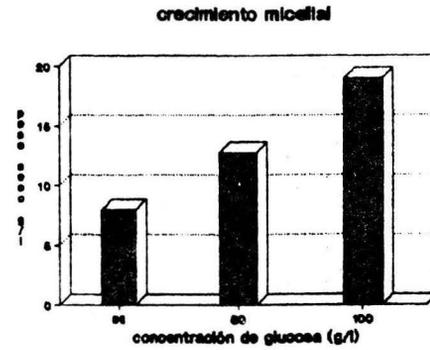
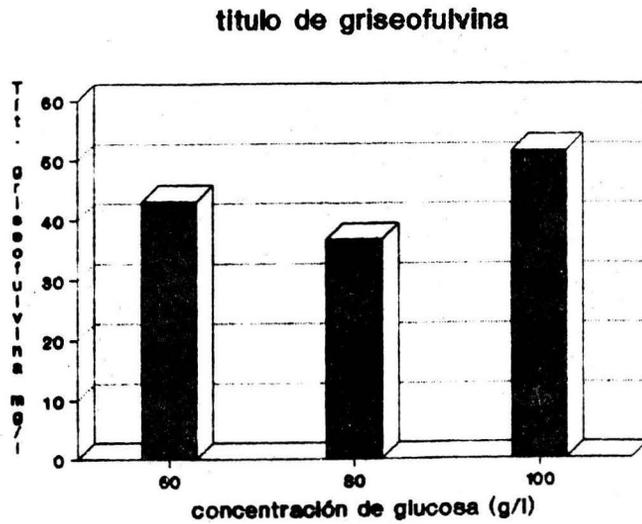


Fig.8 Efecto de la concentración de glucosa sobre título ($\mu\text{g/ml}$), crecimiento micelial (g/l) y producción específica (mg griseofulvina/ g cél) en cultivos de *P. griseofulvum* en matraces de 500 ml con deflectores.

Efecto de la concentración de NaNO_3

Con una concentración de NaNO_3 de 1.5 g/L, se obtuvo un título de griseofulvina de 30 ug/mL siendo ligeramente menor a los obtenidos a concentraciones de 2.5 y 3.5 g/L, los cuales dieron títulos de 36.69 y 35.97 ug/mL, respectivamente (Fig. 9).

Respecto al efecto de NaNO_3 sobre el crecimiento micelial, este aumentó conforme su concentración fue menor, siendo de 10.3 g/L a 15 g/L de la fuente de nitrógeno. Así, la producción específica disminuyó con la mas alta concentración de NaNO_3 .

Efecto de la concentración de KH_2PO_4

En la Figura 10 se observa que los títulos de griseofulvina obtenidos al utilizar 0.5 y 1.5 g/L de KH_2PO_4 fueron muy cercanos, de 32.39 y 33.59 ug/mL respectivamente; y fueron ligeramente menores al título obtenido con una concentración de 1.0 g/L, que fue de 36.39 ug/mL.

En cuanto al crecimiento micelial se observó un efecto inverso, siendo a 1.0 g/L de KH_2PO_4 donde el crecimiento fue menor, de 12.8 g/L. Por lo tanto, la mayor producción específica se tuvo al emplear 1.0 g/L de KH_2PO_4 .

Martín (1977), mencionan que la biosíntesis de antibióticos derivados de policétidos, como es el caso de la griseofulvina, es extremadamente sensible a la concentración de fosfatos.

Efecto de la concentración de NaCl

En la Figura 11 se presenta el efecto de la concentración de NaCl sobre el título de griseofulvina en donde a una concentra-

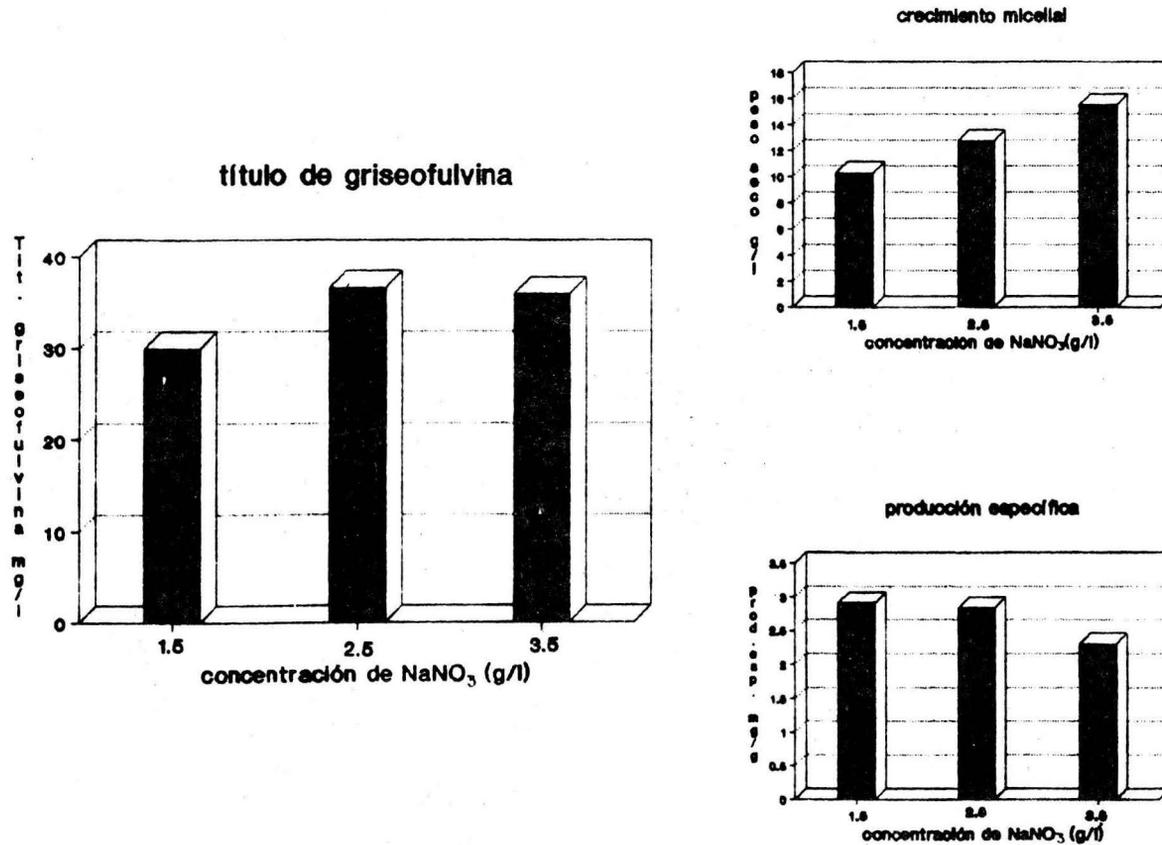


Fig. 9 Efecto de la concentración de NaNO₃ sobre título (µg/ml), crecimiento micelial (g/l) y producción específica (mg griseofulvina/ g cél) en cultivos de *P. griseofulvum* en matraces de 500 ml con deflectores.

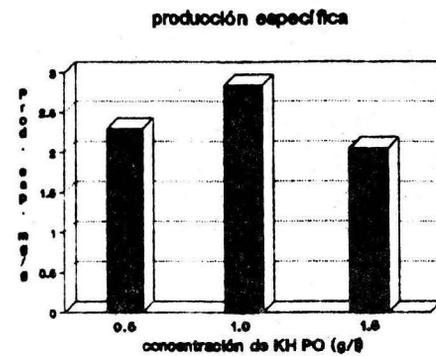
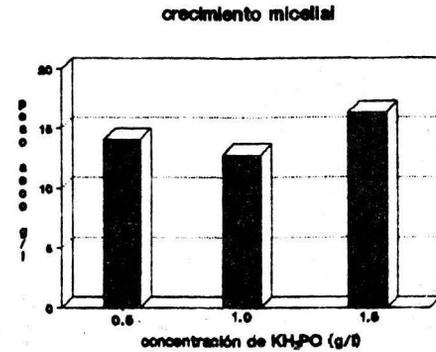
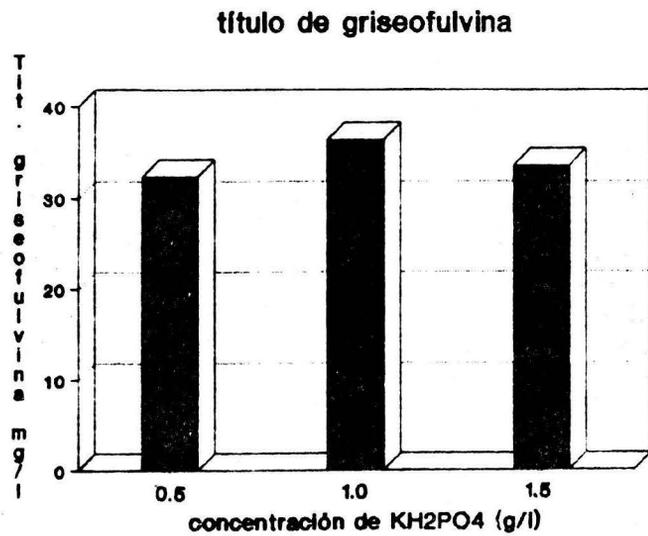


Fig.10 Efecto de la concentración de KH_2PO_4 sobre título ($\mu\text{g/ml}$), crecimiento micelial (g/l) y producción específica (mg griseofulvina/g cél) en cultivos de *P. griseofulvum* en matraces de 500 ml con deflectores.

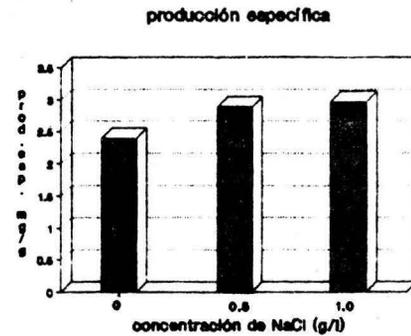
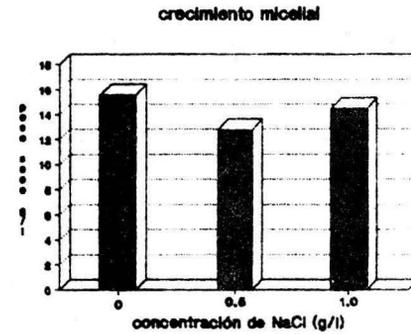
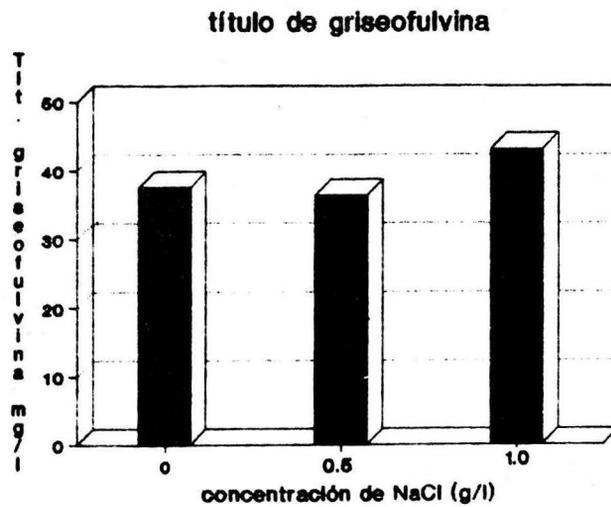


Fig.11 Efecto de la concentración de NaCl sobre título ($\mu\text{g/ml}$), crecimiento micelial (g/l) y producción específica (mg griseofulvina/ g cél) en cultivos de *P. griseofulvum* en matraces de 500 ml con deflectores.

ción de 1.0 g/L se obtuvo un título de 41.14 ug/mL que es mayor, respecto a la concentración de 0.5 g/L y en su ausencia.

El crecimiento micelial en el medio sin NaCl fue de 15.6 g/L, siendo mayor que el crecimiento alcanzado en las otras concentraciones. Al calcular la producción específica, ésta fue mayor en el medio conteniendo 1.0 g/L de NaCl (2.97 ug/g) y muy cercana a lo obtenido con 0.5 g/L del ingrediente (2.89 ug/g).

Efecto de la concentración de MgSO₄

Como se observa en la Figura 12, a medida que aumenta la concentración de MgSO₄, se observa un incremento en el título de griseofulvina; en el medio sin MgSO₄ el título fue de 31.59 ug/mL mientras que con 1.0 g/L el título fue de 40.03 ug/mL.

Por otra parte el mayor crecimiento micelial (12.8 g/L), se observó cuando se utilizaron 0.5 g/L de MgSO₄. En ausencia de esta sal y a concentraciones de 1.0 g/L las cifras obtenidas fueron semejantes (11.2 y 11.6 g/L, respectivamente).

La producción específica fue prácticamente la misma cuando hay 0.5 g/L y en ausencia de MgSO₄, siendo de 2.8 y de 2.84 ug/g, respectivamente. Sin embargo esta cifra aumenta cuando el medio tiene una concentración de MgSO₄ de 1.0 g/L. Aparentemente el MgSO₄ sí tiene un efecto positivo en la producción de griseofulvina.

Los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, sugieren que todos los ingredientes empleados tienen influencia sobre la biosíntesis de griseofulvina, siendo la concentración de

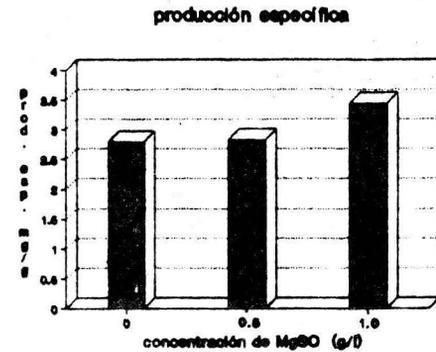
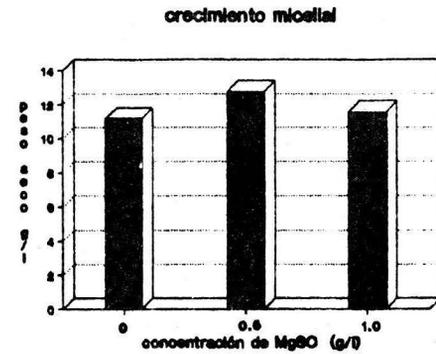
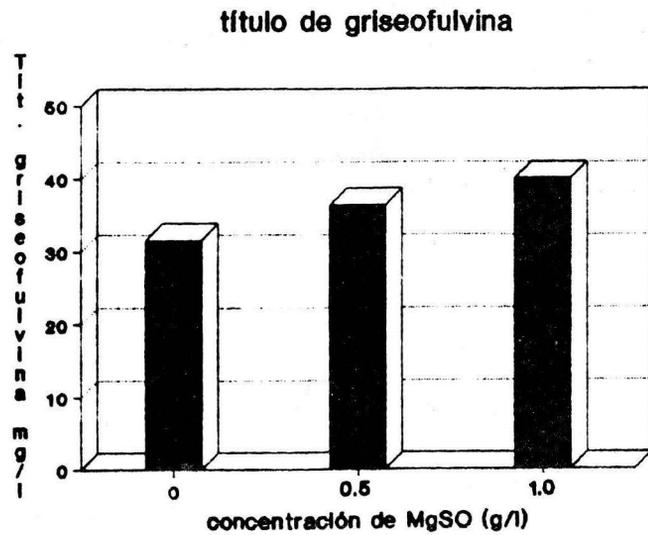


Fig.12 Efecto de la concentración de MgSO sobre título ($\mu\text{g}/\text{ml}$), crecimiento micelial (g/l) y producción específica (mg griseofulvina/ g cél) en cultivos de *P. griseofulvum* en matraces de 500 ml con deflectores.

glucosa la que presenta el efecto mas marcado. Al analizar los resultados de manera integrada se observa que no fue una regla general que aquellas concentraciones favorables para mejorar el titulo de griseofulvina corresponden a las que favorecieron la produccción especifica. Si bien este último parámetro no es comúnmente empleado cuando se quieren analizar mejoras en un proceso, sí da una medida en la que las células canalizan su metabolismo hacia la biosíntesis del producto de interés, o bien para incrementar su masa celular.

Por otro lado, también se observó que los ingredientes incluidos en el medio de cultivo sí son requeridos por el microorganismo para la síntesis de griseofulvina. No obstante, deberán realizarse experimentos que conduzcan a la optimización del medio, tomando como base los resultados obtenidos.

5. Efecto de la oxigenación sobre la producción de griseofulvina

La mayoría de los procesos de fermentación para la producción de antibióticos, requieren un suministro de oxígeno suficiente para satisfacer la demanda del microorganismo tanto para el crecimiento como para la síntesis del metabolito. Ejemplos de esto son la producción de penicilina por *Penicillium chrysogenum*, producción de estreptomycinina por *Streptomyces griseus* (Bartholomew y col., 1950a) y la producción de novobiocina por *Streptomyces niveus* (Maxon, 1959). Generalmente, para soportar el crecimiento, la concentración de oxígeno disuelto debe ser mas alta que un nivel crítico, cuyo valor es específico para cada microorganismo. En algunos casos, los requerimientos de oxígeno para el crecimiento son similares a los que estimulan la formación del producto. En otros casos, las condiciones de oxigenación necesarias para la formación óptima de un producto pueden ser diferentes de aquellas que favorecen la síntesis de biomasa, como en el caso de *Cephalosporin* sp. que para dar un óptimo crecimiento, la cantidad de oxígeno disuelto debe ser mas alta que el nivel crítico, mientras que para la producción de capreomicina el oxígeno disuelto deberá estar por debajo de dicho nivel crítico (Stanbury, 1984).

Para abastecer la oxigenación requerida en recipientes mayores generalmente se proporciona agitación mecánica y se inyecta aire estéril al caldo a través de difusores.

De acuerdo a Bartholomew y col. (1950), la transferencia de oxígeno desde el aire hasta la célula durante la fermentación consta de varios pasos, siendo los mas importantes los siguientes:

- 1) la transferencia de oxígeno contenido en una burbuja de aire a la fase acuosa, y
- 2) la transferencia del oxígeno disuelto al interior de la célula,

Con el fin de asegurar un abastecimiento de oxígeno, algunas veces se inyectan grandes volúmenes de aire. Sin embargo, aún así no se logran concentraciones de oxígeno disuelto suficientemente altas ya que la baja solubilidad del oxígeno en un medio acuoso, la presencia de solutos y la temperatura actúan como factores limitantes. Esta dificultad puede reducirse si se proporciona agitación, ya que mediante el incremento de la velocidad de los impulsores, se aumenta la transferencia de masa y consecuentemente la concentración de oxígeno. Así, la oxigenación en un fermentador puede manipularse utilizando dos variables, el flujo de aire y la velocidad de agitación. La concentración de oxígeno disuelto elegida para una fermentación específica puede ser alcanzada individual, secuencial o simultáneamente manipulando estas dos variables (Onken y Weiland, 1985).

La agitación favorece la transferencia de oxígeno de la siguiente forma:

- 1) incrementa el área disponible para la transferencia de oxígeno dispersando el aire en el cultivo en forma de pequeñas burbujas,
- 2) retrasa el escape de las burbujas de aire contenidas en el líquido,
- 3) previene la coalescencia de las burbujas de aire, y
- 4) disminuye el espesor de la película del líquido en la interfase de gas/líquido mediante la creación de turbulencia en el cultivo (Stanbury, 1984).

Debido a que el oxígeno es un parámetro crítico en fermentaciones aerobias, se consideró importante conocer su influencia sobre la fermentación de *griseofulvina*, ya que la literatura menciona poco en relación a los niveles de oxigenación requeridos.

Utilizando fermentadores de 14 litros, se probaron diferentes condiciones de aereación y agitación. Para conocer el efecto de la aereación se hicieron experimentos variando el flujo de aire a 5, 10 y 15 litros por minuto lo que corresponde a velocidades de aereación de 0.5, 1.0 y 1.5 vvm, respectivamente, manteniendo una misma velocidad de agitación, que fue de 400 rpm.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 13. Como se observa, el perfil de producción de *griseofulvina* (Fig. 13A) obtenido con una velocidad de aereación de 1.5 vvm fue similar al observado con 1.0 vvm. Sin embargo, podemos observar que con 1.5 vvm se obtuvo el máximo título, de 70 ug/mL en 5 días mientras que en el fermentador con 1.0 vvm, se produjeron cerca de 60 ug/mL hasta los 7 días.

Cuando la velocidad de aereación fue de 0.5 vvm el máximo título alcanzado fue de sólo 35 ug/mL hasta el día 8, después de ese tiempo ya no se observó incremento en la producción de *griseofulvina*.

En cuanto al crecimiento (Fig. 13B) se presentó un desarrollo similar en las 3 fermentaciones, alcanzándose alrededor de 10 g/L a los 10 días. Sin embargo, a 1.5 vvm hubo una disminución de la masa micelial después de ese tiempo, que se vió reflejada en las características del caldo el cual presentó una apariencia mucho menos viscosa y con células aparentemente fragmentadas.

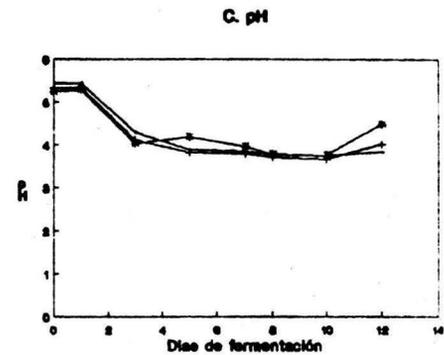
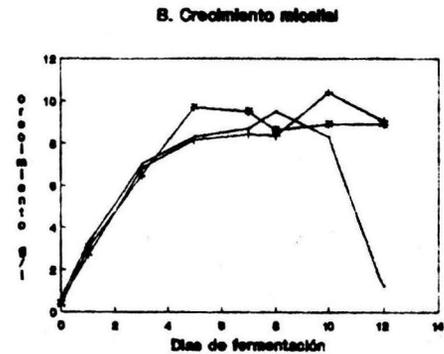
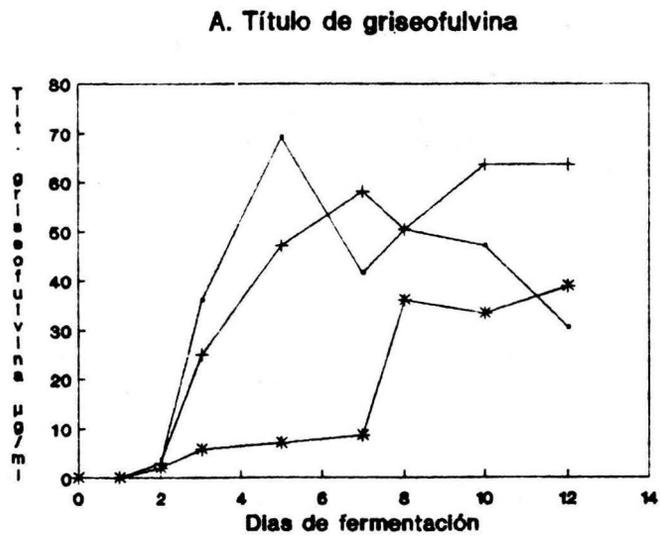


Fig.13 Perfiles de las fermentaciones para la producción de griseofulvina obtenidas al cultivar *Penicillium griseofulvum* NRRL 2150A en fermentadores de 14 litros a 400 rpm con diferentes velocidades de aeración 1.5 vvm (---), 1.0 vvm (-.-.-) y 0.5 vvm (-.-.-)

El pH a lo largo del cultivo presentó un perfil similar en las tres condiciones de aereación, disminuyó de 5.3 a 4.1 los tres primeros días y se mantuvo entre 4.1 y 3.8 hasta los 10 días, después tendió a subir (Fig. 13C).

Al integrar los resultados (Fig. 14) calculados para el día 5, que fue cuando las fermentaciones a 1.0 y 1.5 vvm alcanzaron prácticamente su máximo, observamos que, tomando como referencia la fermentación realizada a 0.5 vvm, el título se incrementó notablemente conforme la aereación aumentó. Así, los incrementos en la producción específica a 1.0 y 1.5 vvm fueron de 702 y 1056%, respectivamente.

En la productividad volumétrica hubo un aumento del 96% a 1.0 vvm, y de 326% a 1.5 vvm. La productividad específica presentó un incremento del 69% para 1.0 vvm, y de 344% con 1.5 vvm. Como se puede notar, al utilizar la mayor cantidad de aire, se lograron los mejores resultados.

Para evaluar el efecto de la velocidad de agitación, se llevaron a cabo fermentaciones a 250 y 400 rpm. De acuerdo a la práctica, con estas velocidades puede lograrse buena oxigenación, una agitación de 400 rpm no es tan excesivamente agresiva como para dañar a las células y la diferencia entre estas dos velocidades permite apreciar el cambio en transferencia de oxígeno, que aumenta aproximadamente 4 veces en los fermentadores empleados (S. Saval, comunicación personal). Se utilizó una aereación baja, de 0.5 vvm para poder observar claramente el efecto de la agitación.

Como se observa en la Figura 15A, a 250 rpm la griseofulvina se detectó hasta el día 7 y se mantuvo constante hasta el día 10

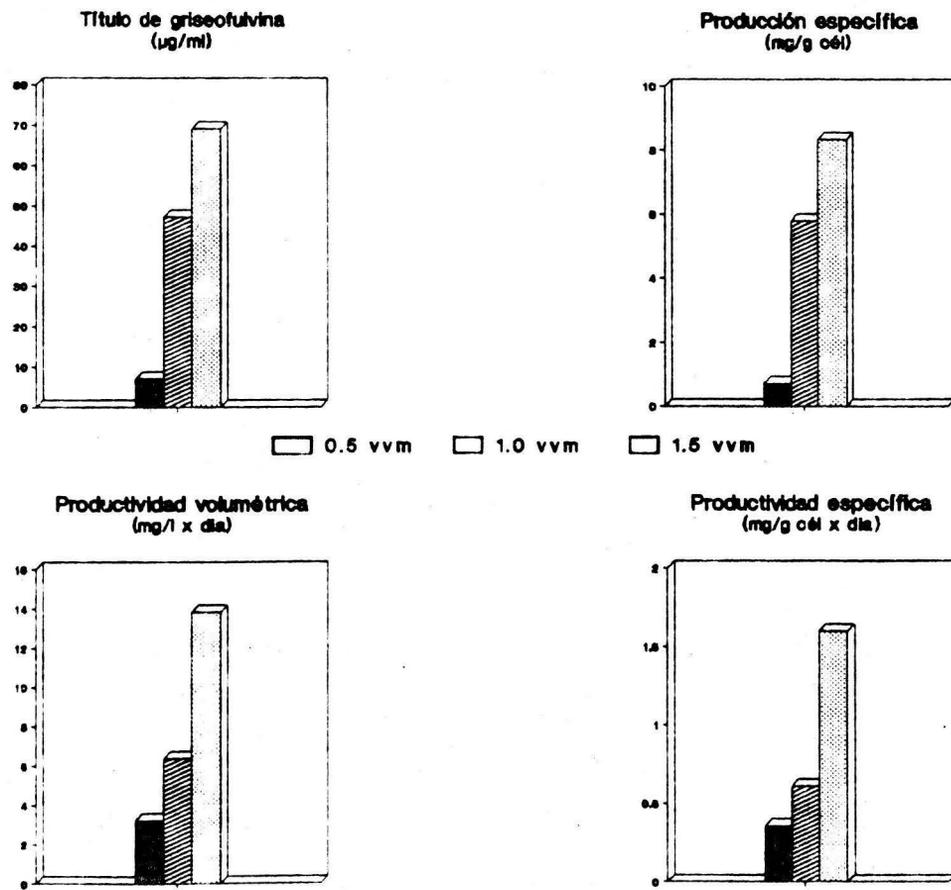


Fig. 14 Efecto de la velocidad de aeración sobre la fermentación de griseofulvina a nivel de fermentadores de 14 litros.

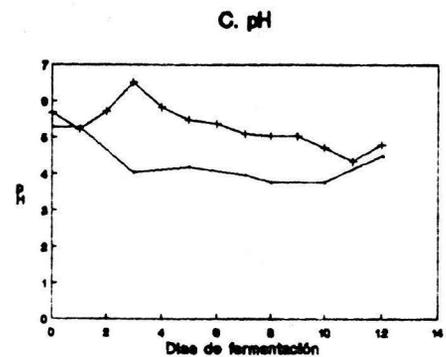
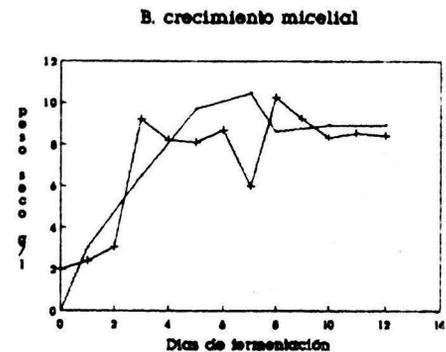
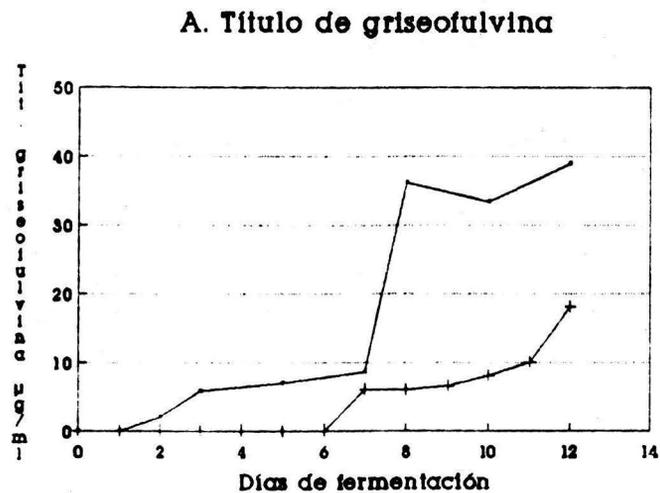


Fig.15 Perfiles de las fermentaciones para la producción de griseofulvina obtenidos al cultivar *Penicillium griseofulvum* NRRL 2150A en fermentadores de 14 litros con una velocidad de aeración de 0.5 vvm a diferentes velocidades de agitación, 400 rpm (—) 250 rpm (+--+)

después del cual se presentó un ligero incremento de tal forma que el día 12 se cuantificaron 18 ug/mL. A 400 rpm la producción de griseofulvina se detectó desde el segundo día incrementándose a lo largo del tiempo hasta alcanzar 39 ug/mL el día 12.

En cuanto al crecimiento observado en las dos velocidades de agitación no se presentan diferencias importantes a pesar de que a 250 rpm hubo mucha variación (Fig. 15B). Estos resultados, aunados a los obtenidos con diferentes velocidades de aereación parecen indicar que el crecimiento no se ve afectado por la oxigenación.

Los perfiles de pH son distintos entre sí, manteniéndose mas bajo cuando la velocidad de agitación fue de 400 rpm (Fig. 15C), mientras que a 250 rpm el pH muestra tendencia a subir al principio y bajar casi al final de la fermentación.

Tomando como referencia la fermentación realizada a 250 rpm, al integrar los resultados se observa en la Fig. 16 que el título se incrementa al aumentar la velocidad de agitación. En la producción específica, se logra un incremento del 624%; en la productividad volumétrica 116% y en la productividad específica 111%. La notable mejora en la productividad se debió también a la reducción del tiempo de fermentación.

Los resultados obtenidos indican que para *Penicillium griseofulvum* la oxigenación es un factor de suma importancia durante la biosíntesis de griseofulvina. Las variables que determinan el grado de oxigenación, que son la agitación y la aereación mostraron fuerte influencia sobre el título de producción y el tiempo en que éste alcanzó su máximo, lo cual se reflejó principalmente en la productividad volumétrica. No obstante, el título de pro-

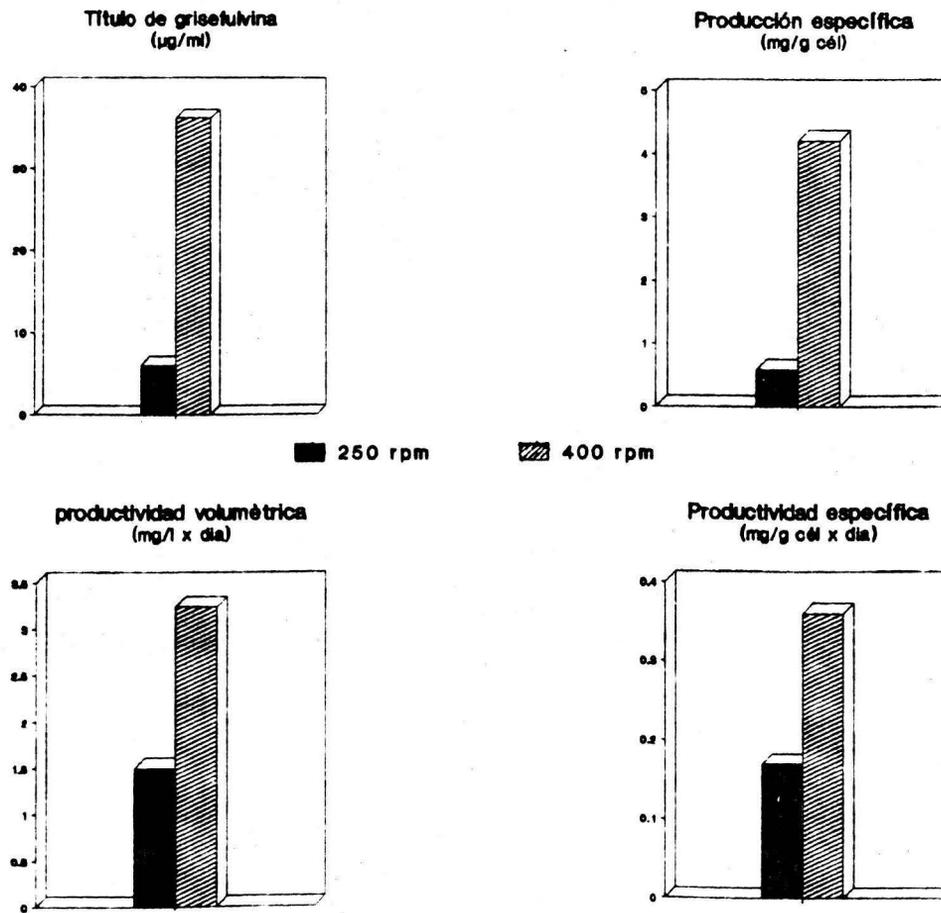


Fig.16 Efecto de la velocidad de agitación sobre la fermentación de griseofulvina a nivel de fermentadores de 14 litros.

ducción obtenido en fermentadores es menor al que se alcanzó en matraces con deflectores, por lo que podemos pensar que a niveles de oxigenación aún mas altos se podrían lograr mejores resultados.

VII. INTEGRACION DE RESULTADOS

Como objetivo general de este trabajo se planteó la realización de un estudio sobre la producción fermentativa de griseofulvina en cultivo sumergido, debido a la inexistencia de información del proceso y a la importancia del antibiótico.

La creación de un nuevo proyecto presenta un gran interés, sobre todo en el campo de la biotecnología. Sin embargo, una de las partes más difíciles es precisamente el inicio de cualquier proyecto ya que generalmente se trabaja bajo condiciones no reportadas en la literatura y que deberán adaptarse al proceso conforme se presenten situaciones nuevas o no predecibles.

En nuestro caso, si bien la obtención de las patentes contribuyó de manera importante para el conocimiento del proceso, estas fueron obtenidas justamente al término del trabajo experimental, ya que su adquisición no fue fácil, pues requirió de mucho tiempo y buena voluntad. Esto complicó la tarea de arrancar el proyecto, el cual prácticamente se inició sin ninguna información segura o completa.

El primer paso que se dió fue el montaje de la técnica de cuantificación por ensayo microbiológico, el cual requirió bastante tiempo para establecer las condiciones que permitieran obtener resultados reproducibles. Posteriormente se eligió el medio de cultivo para la producción de griseofulvina, buscando que sus ingredientes fueran grado industrial y agua de la llave, requisitos indispensables por sus bajos costos en un proceso con miras de escalamiento.

Penicillium griseofulvum fue la cepa seleccionada entre otras, ya que produjo el mayor título de griseofulvina en el medio establecido. La síntesis de griseofulvina ocurrió de manera muy lenta, necesitándose más de doce días de fermentación para una máxima producción, aún cuando el uso de matraces con deflectores redujo el tiempo. Los resultados obtenidos fueron indicativos de la marcada influencia del oxígeno sobre la fermentación.

Tratando de establecer las bases para una posterior optimización del medio, se evaluó el efecto de la concentración de cada uno de los ingredientes en la producción de griseofulvina de manera muy general. Aunque no pudieron establecerse concentraciones cercanas a la óptima, los resultados obtenidos permiten identificar algunos aspectos de investigación futura como es el conocimiento de los mecanismos regulatorios de la biosíntesis de la griseofulvina.

Un aspecto que permitió la reducción del tiempo de producción fue la mejora de la oxigenación en el cultivo. Aunque en la literatura se menciona que el grado de aeración es importante, poco se conoce acerca de su efecto real sobre el proceso. A nivel de fermentadores de 14 litros se confirmó que el tiempo de fermentación mejoró al incrementar la cantidad de oxígeno en el medio ya sea mediante un aumento en la velocidad de agitación o de aeración. Esto reafirma que el proceso presenta muchos aspectos pocos conocidos, a los que en otras fermentaciones como la de penicilina utilizando *P. chrysogenum* o la de ácido cítrico con *A. niger*, se les ha dado gran atención debido precisamente a las implicaciones de llevar el proceso a escala industrial.

Otro punto de interés en el trabajo realizado es la variabilidad observada durante el proceso fermentativo. Hubiera sido deseable el poder incluir muchas repeticiones de cada uno de los parámetros a las diferentes condiciones de estudio para obtener conclusiones más firmes.

Sin embargo, esto no fue posible dada la poca disponibilidad de equipo y el tiempo requerido para esto. Eso no significa que los resultados obtenidos carezcan de valor ya que son el punto de partida de otras investigaciones, pero si surge la necesidad de profundizar en estudios estadísticos para poder comprender y controlar la variabilidad de los sistemas biológicos.

La investigación en México, necesita forzosamente dirigir sus proyectos hacia las necesidades actuales del país. Desafortunadamente, la tecnología de las fermentaciones industriales practicadas actualmente, provienen de países extranjeros, así, las condiciones requeridas para la obtención de productos se encuentran aseguradas bajo patentes, a las cuales obviamente se tiene difícil acceso.

Con el presente trabajo se logra que esta información se encuentre al alcance de quienes sea requerida, de ahí la importancia de los resultados obtenidos.

Por otra parte, si bien, los resultados obtenidos en este estudio, no reúnen todos los conocimientos necesarios para desarrollar el proceso a nivel de planta piloto, la experiencia adquirida permite sentar bases para su realización ya sea en la continuación de este proyecto o para asimilar más fácilmente y mejorar incluso, una tecnología extranjera para la producción fermentativa de griseofulvina.

VIII. CONCLUSIONES

1. Con un medio conteniendo glucosa, nitrato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de sodio y sulfato de magnesio todos de grado industrial y agua de la llave, *Penicillium griseofulvum* NRRL 2150A produjo un título de griseofulvina de 106 ug/mL en 12 días, el más alto en comparación con otras cepas probadas utilizando el mismo medio de cultivo.
2. El tipo de matraces influyó de manera importante en el tiempo de fermentación. Al utilizar matraces con deflectores se redujo el tiempo en el que se inicia la síntesis de griseofulvina y se incrementó el título.
3. Al variar las concentraciones de los ingredientes del medio se observó que aquellas que son favorables para mejorar el título de griseofulvina no coinciden con las que favorecen el crecimiento del hongo.
4. Todos los ingredientes incluidos en el medio son requeridos por el microorganismo para la síntesis de griseofulvina, siendo la glucosa la que presenta el efecto más marcado.
5. En fermentadores de 14 litros se confirmó que la disponibilidad de oxígeno determina el éxito de la fermentación. El título más alto, de 70 ug/mL a los 5 días, se alcanzó a una velocidad de agitación de 400 rpm y un suministro de aire de 15 L/min (1.5 vvm).

IX. RECOMENDACIONES

Con este trabajo quedó confirmada la necesidad de llevar a cabo investigación tendiente a generar conocimientos en relación a la fermentación de griseofulvina. Algunas propuestas de investigación que podrían sugerirse para la continuación del proyecto son las siguientes:

1. Evaluar el efecto de la incorporación al medio de cultivo, de otras fuentes de carbono y nitrógeno, por ejemplo, probar el efecto de la adición de agua de cocimiento de maíz, ya que según la literatura estimula la biosíntesis de griseofulvina.
2. Realizar investigaciones más profundas sobre el efecto de la concentración de los ingredientes del medio, que conduzca a su optimización, así como probar adiciones de glucosa a diferentes tiempos.
3. Realizar estudios para el mejoramiento genético de la cepa con el fin de obtener mutantes hiperproductoras estables, para aumentar los títulos de producción.
4. Buscar o desarrollar otra técnica de cuantificación para griseofulvina, más sencilla, económica, específica y rápida, que permita conocer títulos de producción en tiempos muy cortos.
5. Desarrollar un procedimiento de recuperación de griseofulvina a partir del paquete micelial y no solamente del caldo de cultivo.
6. Realizar estudios que permitan conocer los mecanismos que regulan la síntesis de griseofulvina.
7. Optimizar las condiciones de agitación y de aeración en fermentadores de 14 litros para obtener mayores títulos del antibiótico.

APENDICE 1

CUANTIFICACION DE GRISEOFULVINA POR ENSAYO MICROBIOLOGICO

La necesidad de una cuantificación es de gran importancia en lo que se refiere a sustancias medicinales. Muchos agentes medicinales consisten de una única sustancia activa que puede ser caracterizada completamente en términos de sus propiedades químicas, fisico-químicas y puramente físicas. Otros, particularmente aquellos de origen natural, pueden ser de características más variables, por ejemplo, pueden estar constituidas de una mezcla de sustancias químicamente similares pero que difieren en sus efectos biológicos, o bien pueden incluir sustancias químicamente diferentes con actividad biológica similar (Hewitt, 1977).

Frecuentemente, una sustancia tiene un valor terapéutico reconocido antes de que su composición química haya sido descubierta. Cuando por alguna razón un agente medicinal potencialmente valioso no puede ser definido en términos de sus propiedades químicas o fisico-químicas, entonces la alternativa es considerar sus propiedades biológicas. En este último caso, se puede citar el empleo de organismos de prueba para evaluar una actividad biológica.

Generalmente, para conocer la concentración de antibiótico presente en una muestra, se evalúa la inhibición del crecimiento de un sistema biológico específico. En este caso, una cantidad conocida de antibiótico es utilizada como estándar sobre un microorganismo de prueba, el efecto de cualquier otra muestra sobre el mismo microorganismo puede ser comparado con el de la

preparación estándar, y de esta manera se puede obtener una potencia relativa cuantitativa. La base de este método es la comparación cuantitativa del efecto de las dos sustancias sobre el crecimiento del microorganismo de prueba (Hewitt, 1977).

Desafortunadamente las actividades biológicas no se pueden cuantificar fácilmente, las pruebas para medir la potencia mediante métodos puramente biológicos han tenido menor éxito que el esperado, debido a la inherente variabilidad del sistema biológico. Es común que los resultados no sean muy reproducibles en diferentes laboratorios, ni aún en el mismo laboratorio en diferentes ocasiones. Las limitaciones de estos métodos son reconocidas, pero son aceptadas en ausencia de mejores alternativas de análisis (Hewitt, 1977).

Sin embargo, si la condición de similaridad es aplicable, es decir, que si la sustancia en estudio causa una respuesta característica sobre el microorganismo de prueba, descrita como constituyente efectivo, entonces la respuesta a la preparación desconocida se debe sólo al mismo constituyente efectivo y no se modifica por la presencia de otras sustancias, significa que el método es sumamente específico, además de que se puede obtener cierta linealidad en la respuesta.

Durante el desarrollo de este trabajo, la cuantificación de la griseofulvina obtenida de los caldos de fermentación se hizo mediante ensayo microbiológico por las siguientes razones:

- 1) se tiene una mayor facilidad de llevarla a cabo ya que es un método que no requiere de un equipo sofisticado, y
- 2) es un método relativamente rápido, económico y específico, que permite trabajar varias muestras de manera simultánea.

Fundamento de la metodología

En la literatura se reporta que el crecimiento del hongo *Microsporium gypseum* es sensible a la presencia de griseofulvina, razón por la que es utilizado como microorganismo de prueba (Nona y col., 1968; Everette y col., 1963; Gregoriu y Gregoriu, 1970; Code of Federal Regulation, 1966). En el caso particular de este trabajo se utilizó la cepa de *Microsporium gypseum* ATCC 14683 (Nona y col., 1968) para montar la metodología adecuada a nuestras condiciones de trabajo.

Montaje de la técnica

Durante el montaje de la técnica microbiológica se llevaron a cabo numerosas pruebas, efectuando cada vez las modificaciones pertinentes para obtener resultados confiables. Las variables manejadas fueron las siguientes:

- 1) la concentración y la forma de adición del microorganismo prueba al medio de ensayo,
- 2) el tiempo de incubación de las cajas,
- 3) la forma de adición de la solución estándar de griseofulvina y tiempo de difusión, y
- 4) la preparación de las muestras de fermentación.

Estos aspectos se describen a continuación de manera integrada.

Se reporta que *M. gypseum* (Code of Federal Regulation, 1966) requiere de más tiempo de incubación respecto a otros microorganismos de prueba, necesita por lo menos 48 horas de incubación.

Sin embargo, después de este tiempo el crecimiento fue irregular, por lo que se decidió dejar pasar otros días más hasta obtener un crecimiento uniforme. El tiempo mínimo requerido para observar límites bien definidos de los halos de inhibición del crecimiento de *M. gypseum* fue de 4 días a 29°C.

La primera técnica probada fue la reportada por Nona y colaboradores (1968), utilizando placas con dos capas de medio, una de ellas adicionada de cloramfenicol y la otra conteniendo el microorganismo prueba. Después de la incubación se observó que el desarrollo de *M. gypseum* fue demasiado lento, por lo que en una siguiente prueba se eliminó el cloramfenicol del medio con lo que se obtuvo un crecimiento mucho más rápido y uniforme. Se sabe que el cloramfenicol se adiciona para evitar la contaminación del medio por bacterias, sin embargo, en nuestro caso el crecimiento del microorganismo se vió afectado por lo que se desechó su uso para las siguientes pruebas.

También se probó otra técnica reportada por Gregoriu y Gregoriu (1970) en la cual el microorganismo de prueba se dispersó con una asa de vidrio sobre la superficie del agar ya solidificado, posteriormente los discos impregnados con la solución de griseofulvina se colocaron en la superficie. Con esta técnica no fue posible obtener halos bien definidos.

Al mismo tiempo, se hicieron pruebas agregando diferentes cantidades de esporas de *M. gypseum* al medio. Una vez establecida la densidad óptica de la suspensión de esporas, el volumen inicial agregado al medio se fue incrementando hasta observar que su desarrollo tuviera una apariencia como de gamuza de color beige, pero que pudiera delimitarse un halo de inhibición regular. Después de muchas observaciones se determinó que 0.2 mL de la

suspensión de esporas con una densidad óptica de 0.5 leída a 580 nm fue adecuada para inocular cada 100 mL de medio.

Otros factores de gran importancia que se observaron fueron el tiempo de crecimiento y de conservación de la cepa de *M. gypseum* necesarios para realizar la prueba. Las esporas recién cosechadas que eran inoculadas casi inmediatamente al medio, presentaban un crecimiento demasiado lento (de alrededor de 8 días) por otra parte, las esporas viejas (de más de dos semanas en refrigeración) tenían un crecimiento muy irregular. Con esto se estableció que el tiempo de crecimiento de *M. gypseum* más favorable para llevar a cabo el bioensayo fue de 10 días a 29°C y el tiempo de conservación en frío fue máximo de 5 días para asegurar un crecimiento regular del hongo al realizar el ensayo.

En relación a la forma de adición de la solución estándar de griseofulvina se probaron varias alternativas. Una de ellas consistió en colocar los discos de papel filtro (diámetro 0.6 mm marca Schleicherf Schuell Inc, USA) impregnado con las diferentes soluciones estándar de griseofulvina entre dos capas de medio donde además de las dificultades para la colocación de estos, los resultados no fueron nada confiables debido a la poca inhibición del crecimiento del microorganismo de prueba. Posteriormente se probó otra técnica en la cual se depositaron las diferentes soluciones estándar de griseofulvina dentro de pequeños cilindros hechos en el agar con un sacabocados (Nona y col., 1968; Everett y col., 1963), aquí la respuesta de inhibición del crecimiento fue aún menor respecto a la prueba anterior.

Por último, los discos fueron colocados en la superficie del agar solidificado, con lo cual los halos de inhibición fueron más

claros, aunque no estrictamente regulares. Con base en estos resultados se decidió realizar las determinaciones utilizando esta técnica.

Para obtener la curva de calibración, se preparó una solución stock de griseofulvina, a una concentración de 1000 mg/mL, disuelta en dimetilformamida debido a que presentó mayor solubilidad en comparación con otros solventes. Las diluciones se llevaron a cabo con una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 8.0. A pesar de que en la literatura se reportan concentraciones mínimas detectables tan bajas como 5.0 ug/mL (Code of Federal Regulation, 1966) en los experimentos realizados no se observó inhibición del crecimiento a concentraciones menores a 50 ug/mL, por lo que se utilizaron concentraciones por arriba de ésta, con intervalos de 50 ug/mL hasta llegar a los 1000 ug/mL. Con esta última concentración el halo tampoco fue regular, por lo que se decidió utilizar un intervalo de concentraciones de 50 a 500 ug/mL para construir la curva de calibración que se presenta en la Figura 17.

Una vez establecidas las condiciones para el bioensayo utilizando las soluciones estándar, se iniciaron las pruebas para establecer la técnica de cuantificación de griseofulvina presente en muestras de fermentación. El primer intento se hizo aplicando 20 ul de muestra directamente sobre los discos para antibiosis, al final del período de incubación se observó de que a pesar de que los halos no estaban bien definidos, la zona de inhibición era mayor con las muestras de los últimos días de fermentación. Esto sugería que sí había griseofulvina en las muestras, pero que que tal vez en muy baja concentración, por lo que se incrementó a 40 ul el volumen de muestra, sin embargo el disco no tenía la

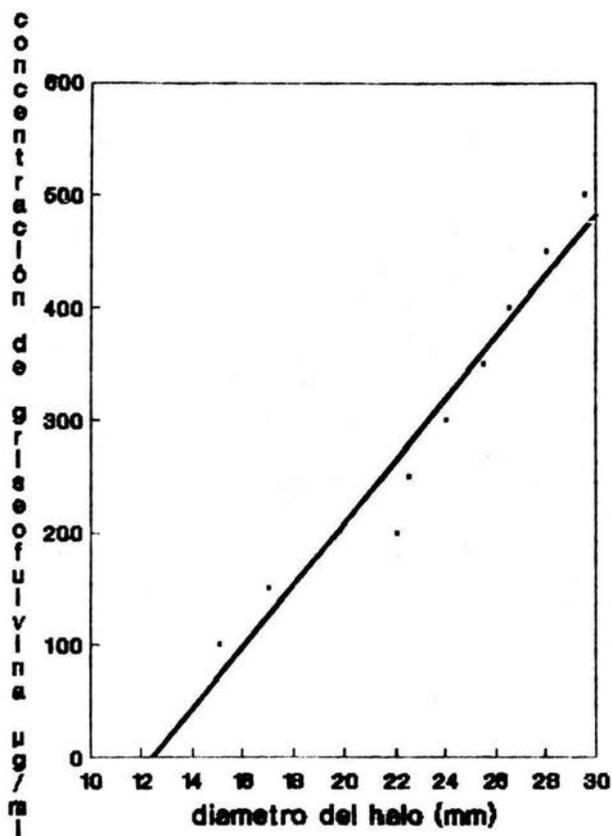


Fig.17 Curva de calibración para la determinación de griseofulvina por ensayo microbiológico

capacidad de absorber totalmente la muestra, por lo que se usaron discos de mayor tamaño donde se inyectaron 40 y 60 ul , volumen que era totalmente absorbido. Los resultados que se obtuvieron tampoco fueron satisfactorios ya que existía todavía dificultad para delimitar los halos de inhibición.

Se consideró entonces la conveniencia de concentrar la muestra, eliminando el agua con una corriente de aire, con lo cual se obtuvieron resultados favorables. Debido a la gran cantidad de muestras y a la lentitud de este proceso, las muestras fueron concentradas por liofilización, posteriormente la materia sólida restante se resuspendió en metanol para obtener una muestra concentrada de 1 a 5 veces. Finalmente 20 ul de estas muestras se aplicaron en los discos de 0.6 mm de diámetro. Los resultados obtenidos fueron mucho más confiables respecto a los anteriores. En la Figura 18 se presentan fotografías de las placas a diferentes tiempos de fermentación, en ellas se observan los halos de inhibición mejor definidos cuyo diámetro se puede medir con más facilidad.

Metodología utilizada durante el estudio

Una vez evaluado el efecto de las variables involucradas en el bioensayo, quedó establecida la siguiente metodología como la definitiva para llevar a cabo el estudio:

Preparación del inóculo:

La cepa de *Microsporum gypseum* se cultiva en cajas con el medio de propagación a 29°C durante 10 días. Las cajas se guardaron en refrigeración a 4°C durante 5 días como tiempo máximo antes de su utilización.

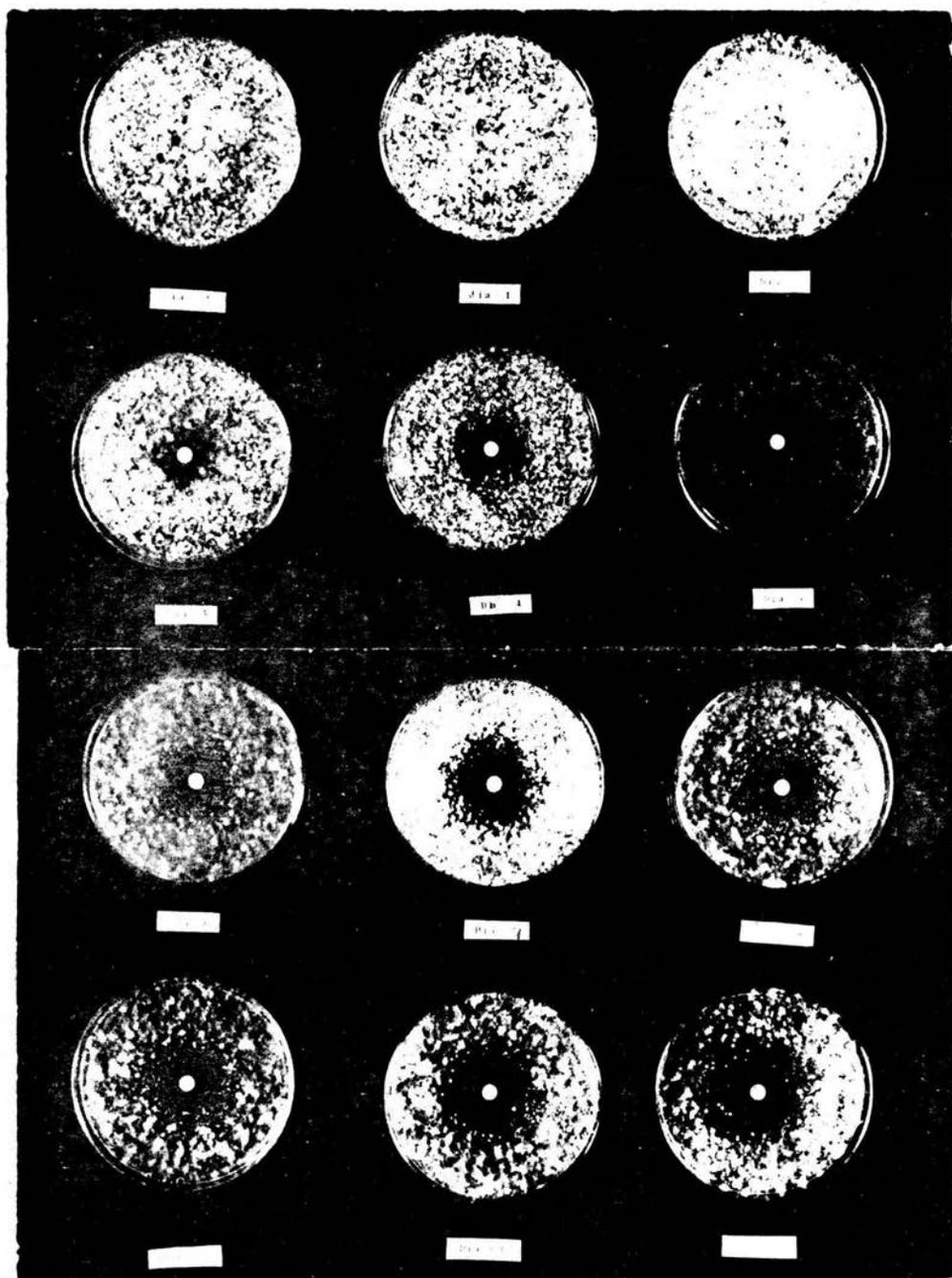


Fig.18 Halos de inhibición de crecimiento de *Microsporium gypseum* con muestras de diferentes tiempos de fermentación.

Preparación de la suspensión de esporas:

Usando una asa microbiológica se toma una cantidad suficiente de esporas de *M. gypseum* y se resuspende en 10 mL de agua destilada estéril, se homogeniza y se lee su densidad óptica a 580 nm en un colorímetro Spectronic 20 (Baush & Lomb).

Inoculación del medio:

Por cada 100 mL de medio para ensayo microbiológico se inoculan 0.2 mL de la suspensión de esporas con una densidad óptica de 0.5 leída a 580 nm. El medio debe mantenerse a una temperatura adecuada para que no solidifique y que a su vez no afecte la viabilidad de las esporas por sobrecalentamiento. Se colocan 15 mL del medio inoculado en cajas petri de 10 cm x 15 mm y se dejan solidificar a temperatura ambiente mientras se preparan los discos.

Preparación de las soluciones estándar:

Se pesan 0.01 g de griseofulvina de referencia y se aforan a 10 mL con dimetilformamida. Con esta solución stock (1000 ug/mL) se hacen diluciones con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 8.0, para obtener las soluciones estándar a concentraciones de 50 a 500 ug/mL con intervalos de 50 ug/mL.

En los discos de papel filtro de 0.6 cm de diámetro (marca Schleicher & Schuell, Inc., U.S.A.), se aplican uniformemente 20 ul de cada solución estándar o de la muestra a cuantificar (previamente concentrada) y se dejan secar completamente. Una vez secos los discos se colocan en las cajas (uno por caja) sobre el

medio inoculado. Se permite la difusión de la muestra a 4°C durante 90 minutos, transcurrido este tiempo se incuban a 29°C. Después de 4 días se mide el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento.

La concentración de griseofulvina en las muestras, se determina tomando como referencia la curva de calibración obtenida con las soluciones estándar.

APENDICE 2

CUANTIFICACION DE GRISEOFULVINA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

Durante las etapas iniciales del desarrollo de cualquier proceso microbiológico un aspecto fundamental que debe considerarse es la identificación de los productos y su cuantificación a través de diversos métodos analíticos, que de manera complementaria, puedan asegurar que se está obteniendo el producto de interés.

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es una de las técnicas analíticas desarrollada más recientemente, que permite identificar y cuantificar de manera más selectiva la concentración de un compuesto, ya que puede separar los diversos componentes contenidos en muestras provenientes de productos naturales, las cuales presentan una diversidad de constituyentes.

Aunque los principios teóricos de la cromatografía de gases (CG) se usaron para la moderna cromatografía líquida de alta resolución, ésta supera a la primera en ciertas áreas de trabajo analítico, especialmente en el análisis de compuestos no volátiles y sustancias iónicas en las cuales se encuentran la mayoría de los compuestos biológicamente activos, como el caso de la griseofulvina.

Debido a la complejidad para la cuantificación de griseofulvina mediante el ensayo microbiológico, se consideró conveniente utilizar la técnica de CLAR como una herramienta analítica de apoyo para confirmar algunos resultados obtenidos por la técnica microbiológica. Para tal efecto se desarrolló la metodología utilizando como punto de partida, lo publicado a este respecto (Hackett y Dusci, 1978; Bailey y Brittain, 1973).

Metodología

Equipo: Se utilizó un cromatógrafo de alta resolución marca Waters Modelo 590 (Millipore) equipado con un detector de luz UV de longitud de onda variable que se operó a 250 nm. Se utilizó una columna uBondapak C₁₈. Las muestras fueron introducidas mediante un inyector de loop variable U6K modelo Waters. La temperatura se mantuvo constante a 25°C.

Fase móvil: se utilizó una mezcla de acetonitrilo al 45% en KH₂PO₄ 45 mM ajustado a un pH de 3.0 con ácido fosfórico, se alimentó a una velocidad de 1 mL/min.

Estándar de griseofulvina: se utilizó griseofulvina obtenida de Sigma Chemical Co, Inc., a partir de la cual se prepararon soluciones a concentraciones de 10 y 100 µg/mL. De éstas se inyectaron alícuotas de 20 y 10 µl al cromatógrafo.

Tratamiento de las muestras: Muestras de 1 mL tomadas durante la fermentación fueron extraídas 2 veces con cloroformo utilizando 2 mL cada vez, se agregó Na₂SO₄ para eliminar el agua del extracto, posteriormente se filtró y se evaporó a sequedad. La muestra se resuspendió con metanol hasta obtener un volumen final de 0.5 mL.

De aquí se tomaron alícuotas de 10 µl para inyectarlas al cromatógrafo. Como control para cuantificar la pérdida de griseofulvina durante las extracciones se preparó el mismo medio que se utilizó para las fermentaciones adicionado de una concentración conocida de griseofulvina; este medio fue tratado de la misma manera que las muestras.

Resultados

En la Figura 19 se presenta el cromatograma A obtenido con 10 μ l de una solución estándar de griseofulvina a una concentración de 10 μ g/mL. Se encontró un tiempo de retención promedio de 5.8 min. En el cromatograma B se presenta la corrida de una muestra de la fermentación llevada a cabo con la cepa *P. griseofulvum* NRRL 2150A en matraces, que corresponde al día 11, en la que previamente se cuantificó el antibiótico por ensayo microbiológico. En el cromatograma B se observan varios picos, de los cuales el de mayor área con un tiempo de retención de 5.8 min corresponde a la griseofulvina, los otros picos probablemente son intermediarios de su síntesis o co-productos.

Después de haber obtenido estos resultados, se procedió a cuantificar la griseofulvina en las muestras que se tomaron durante una fermentación. En la Figura 20 se presenta el seguimiento de la producción de griseofulvina, se puede observar que aparece desde el día 1 aunque en cantidades muy pequeñas, sin embargo la producción aumenta al transcurrir el tiempo. Aparecen además otros picos que por su área son de interés ya que podría tratarse de precursores de la griseofulvina. El perfil de producción de griseofulvina obtenido mediante el ensayo microbiológico se comparó con el obtenido por CLAR, los resultados se presentan en la Figura 21, donde se observa que los dos perfiles tienen el mismo comportamiento. No obstante, la diferencia que existe entre el título cuantificado por CLAR y el obtenido por bioensayo se puede deber a los siguientes factores:

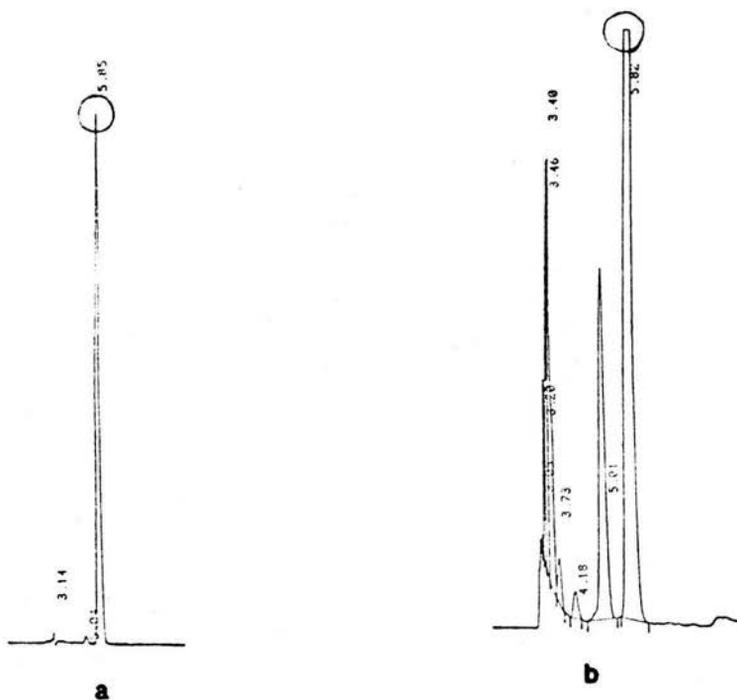


Fig.19 a) Cromatograma de una solución estándar de griseofulvina a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, volumen de muestra: 10 μl

b) Cromatograma de una muestra de caldo de fermentación del día 11

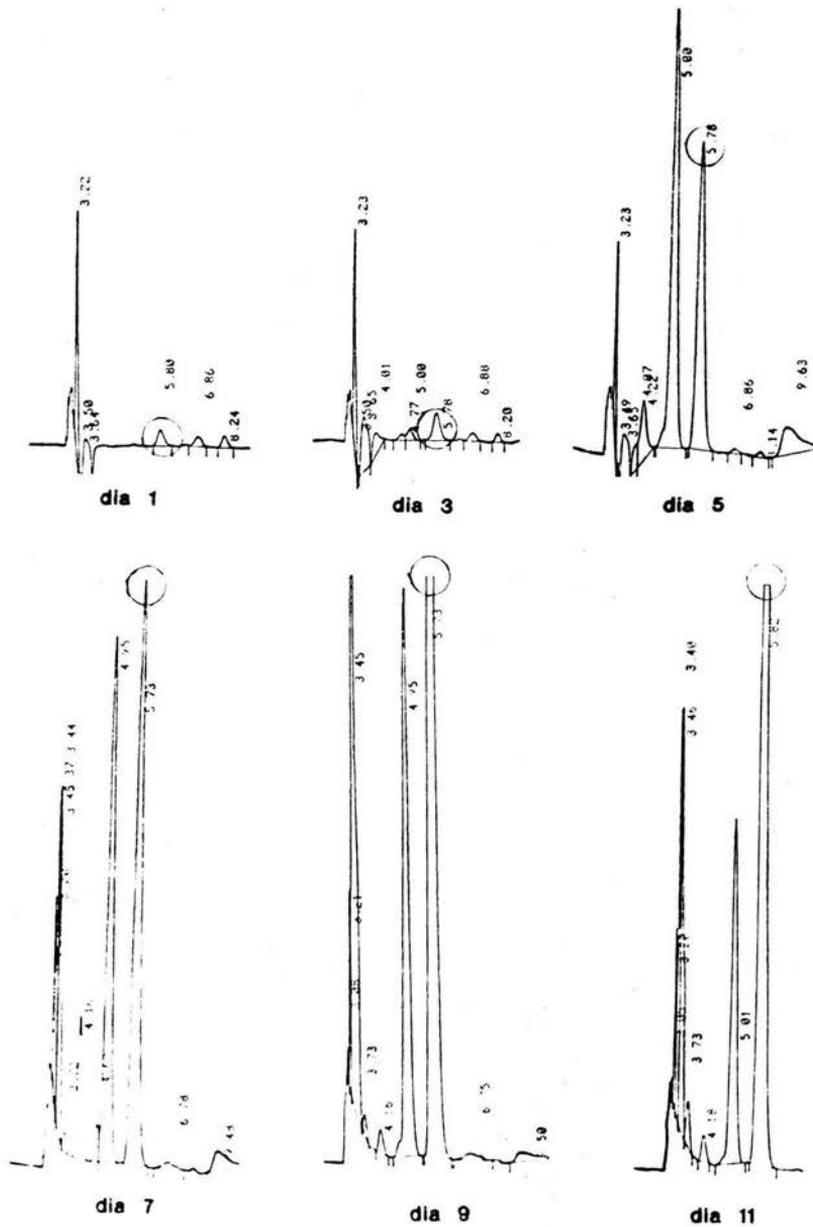


Fig. 20 Cromatograma de muestras de fermentación obtenidas de matraces a diferentes tiempos. La griseofulvina presenta un tiempo de retención promedio de 5.8 minutos.

Producción de griseofulvina

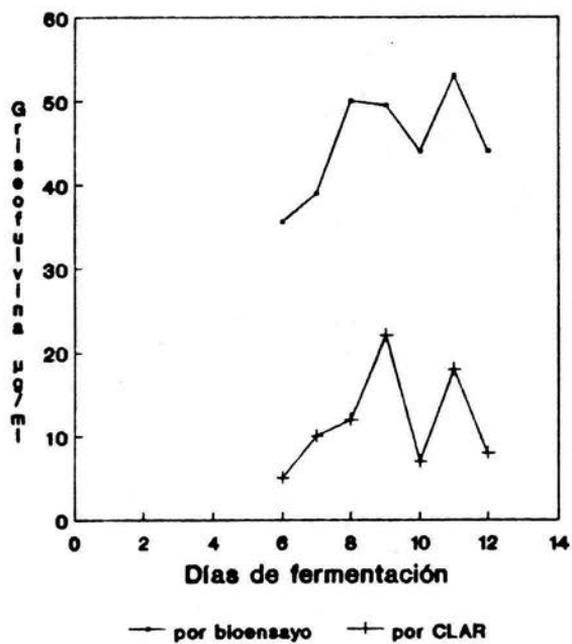


Fig. 21 Perfiles de la producción de griseofulvina cuantificada por CLAR y por ensayo microbiológico.

1. para la cuantificación por ensayo microbiológico la muestra no requiere de tratamientos previos, por lo que no hay pérdida de griseofulvina;

2. el porcentaje de recuperación obtenido para el estándar, de casi el 70 %, se debe a la pérdida del compuesto durante las extracciones que son necesarias para preparar las muestras antes de ser inyectadas al cromatógrafo;

3. el caldo de fermentación seguramente contiene muchos compuestos estructuralmente similares, intermediarios de la síntesis de griseofulvina, que pueden presentar actividad antibiótica lo que aumenta la potencia de la respuesta de inhibición del crecimiento del microorganismo de prueba. Tal vez entre estos intermediarios se encuentre la declorogriseofulvina, la cual se reporta como un co-producto muy unido a la griseofulvina y que presenta actividad antibiótica sobre el mismo microorganismo de prueba (Rhodes, 1963).

Con base en los resultados obtenidos, se puede establecer lo siguiente:

1. la cantidad de griseofulvina cuantificada en las muestras de fermentación, al mostrar una respuesta proporcional utilizando ambos métodos, confirma que la cuantificación por ensayo microbiológico es buena a pesar de las dificultades que se puedan presentar,

2. aunque la CLAR permite cuantificar más específicamente la griseofulvina, el tratamiento previo de las muestras hace que la técnica no sea tan rápida como se deseara.

Si bien la CLAR presenta varias ventajas comparada con el ensayo microbiológico, no se tiene fácil acceso al equipo por lo que el empleo de ésta técnica se ve limitado. Los resultados aquí obtenidos fueron satisfactorios de acuerdo a lo esperado por lo que la CLAR solamente fue empleada para casos específicos y se siguió utilizando de manera rutinaria el ensayo microbiológico con la seguridad de que lo que se cuantificó como sustancia que inhibió el crecimiento del microorganismo de prueba fue griseofulvina.

BIBLIOGRAFIA

- Aharonowitz, Y., 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 209-233
- Arenas, R. 1982. Micosis superficiales. *Atención Médica*, junio: 20-28.
- Bailey, F., and Brittain, P.N. 1973. High-efficiency liquid chromatography in pharmaceutical analysis. *J. Chrom.* 83: 431-437
- Bartholomew, W. H., Karow, E. O., and Sfat, M. R. 1950. Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations. *Ind. Eng. Chem.* 42(9): 1801-1809
- Bartholomew, W. H., Karow, E. O., Sfat, M.R., and Wilhelm, R. H. 1950a. Effect of air flow and agitation rates upon fermentation of *Penicillium chrysogenum* and *Streptomyces griseus*. *Ind. Eng. Chem.*, 42(9): 1810-1815
- Blumer, G. S., Fromtling, R.A. 1983. Pathogenic mechanisms of mycotic agents. En "Fungi pathogenic for humans and animals. Ed. Howard, D.H. Marcel Dekker, Inc., N.Y.
- Birch, A.J., Massey-Westrop, R.A., Richards, R.N., y Smith, H. 1958. Studies in relation to biosynthesis. Part XIII, Griseofulvin. *J. Chem. Soc.* 1958: 360
- Brandl, E., Kleiber, W., Steiner, H., 1969. Fermentative Production of Griseofulvin. British patent 1,159,695
- Brian, P.W., Curtis, P. J., and Hemming, G. H., 1946. A substance causing abnormal development of fungal hyphae produced by *Penicillium janczewskii*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 29: 173.
- Brian, P.W., Curtis, P. J., and Hemming, G. H., 1949. A substance causing abnormal development of fungal hyphae produced by *Penicillium janczewskii*. Identity of curling factor with griseofulvin. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 32: 20
- Calam, C.T., and Smith, G. M. 1981. Regulation of the biochemistry and morphology of *Penicillium chrysogenum*, in relation to initial growth. *FEMS. Microbiol. Lett.* 10: 231-234
- Cejka, A., 1985. Preparation of media. En "Biotechnology" Vol. 2: Fundamentals of biochemical engineering. Ed. H.J.Rehm y G. Reed, Verlag-Chimie,: 629-698
- Code of Federal Regulation Tit.21 Part 130 at the end. January 10.(1986) U.S.C. Government. Griseofulvin secc. 148 G.1 printing office Washington.
- Cooney, C.L., 1985. Growth of microorganisms. En "Biotechnology" Vol.1: Fundamentals. Ed. H.J. Rehm y G. Reed, Verlag-Chimie, p:
- Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud, 1988. Secretaría de Salud. México, D.F.

- Degos, R., Rivalier, E., and Lefort, P. 1959. La griseofulvine dans le traitement des teignes. *Bull. Soc. Franc. Derm. Syph.* 3: 281-288
- Dorey, M. J., Mitchell, L. S. and Walker, C., 1962. Production of griseofulvin U.S. patent 3,069,329
- El-Nakeeb, M. A., McLellan, W. L., and Lampen, J. O. 1965. Antibiotic action of griseofulvin on dermatophytes. *J. Bact.* 89(3) 557-563.
- Everette, W. K., Bowman, F. W., and Kirshbaum, A. 1963. Plate assays for griseofulvin in pharmaceutical preparations and body fluids. *J. Pharm. Sci.* 52: 586-588
- Freedman, D., 1969. The shaker in bioengineering. *Process Biochem. March*: 35-40
- González-Ochoa A., 1960. Griseofulvin in deep mycoses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 89: 255-257
- Griogoriu, D., and Griogoriu, A., 1970. Contribution à la technique de l'antibiogramme anti-fongique. *Mycopathologia et Mycologia applicata* 41(3-4): 373-377.
- Grisham, L. M., and Wilson, L. 1973. Antimicotic action of griseofulvin does not involve disruption of microtubules. *Nature* 244: 294-295.
- Grove, J. F., and Mc Gowan, J. C. 1947. Identity of griseofulvin and "curling factor". *Nature* 160: 574
- Grove, J. F., Mac Millan, J., Mulholland, T. P., and Rogers, M. A. 1952. Griseofulvin Part I *J. Chem. Soc.* 12: 3949-3958
- Gull, K., and Trinci, A. P. 1973. Griseofulvin inhibits fungal mitosis. *Nature* 244: 292
- Hackett, L. P., and Dusci, L. J., 1978. Determination of griseofulvin in human serum using HPLC. *J. Chrom.* 155: 206-208
- Harris, C., Roberson, J. S., and Harris, T. M. 1976. Biosynthesis of griseofulvin *J. Am. Soc.* 98: 5380
- Hashimoto, T., 1991. Infectious propagules of dermatophytes. En *The fungal spore and disease initiation in plants and animals.* Ed. Garry, T. Cole y Harvey C. Hoch. Plenum Press N.Y.
- Hemming, H.G., Lehan, M., Giles, D., and Giles, A. S., 1971. Production of griseofulvin. U.S. patent 3,616,247
- Hewitt, W., 1977. *Microbiology Assay (Quantitative Principles and Evaluation)* Academic Press Inc.
- Hockenull, D. J., 1962. Process for the production of griseofulvin. U.S. patent 3,038,839

- Hockenhuil, D. J., 1962a. Production of griseofulvin. U.S. patent 3,069,328
- Howard, D. H., 1983 Fungi pathogenic for humans and animals. Marcel Dekker Inc., N.Y.
- Huber, F. M., 1974. Griseofulvin. In Antibiotics Vol.3 J.W. Coreoran and F.E. Hahn (Eds) Springer-Verlag, Berlin
- Huber, F. M., Tietz, A. J., 1984. Griseofulvin: proprieties, biosynthesis and fermentation. En "Drugs and pharmaceutical Science" Vol. 22 Ed. Erick J. Vandamme. Marcel Dekker Inc. N.Y.
- Karow, E. O., Bartholomew, W. H., and Sfat, M. R., 1953. Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations. *Agric. Food Chem.* 1(4): 302-306
- Laine, B. M., and Magnoux, C. R., 1971. Production of a griseofulvin composition. U.S. patent 3,607,656
- León, B. V., 1970. Diez dermatofitosis más frecuentes en el centro dermatológico Pascua de México, D.F. Tesis de Licenciatura. Centro Dermatológico Pascua.
- Liefke, E., Kaiser, D., and Onkey, H. 1990. Growth and product formation of *actinomycetes* cultivated at increased total pressure and oxygen partial pressure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32(6): 674-679
- Martin, J. F., 1977. Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv. Biochem. Eng.* 6: 105-127
- Martin, J. F. and Demain, A. L., 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 44(2): 230-251
- Mason, H. R., and Righelato, R. C. 1976. Energetics of fungal growth. Limiting substrate on respiration of *Penicillium chrysogenum*. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 26: 145-152
- Matelová, O., Musílková, M., Necasek, J., and Smejkal, F. 1955. The influence of the oxygen supply on the production of chlorotetracycline. *Præstia* 27: 27-34
- Maxon, W.D., 1959. Aeration and agitation studies on the novobiocin fermentation. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* 1(13):311-324
- Mc Millan, J., 1954. Isolation of the bromo-analogue from *P. griseofulvum* and *P. nigricans*. Griseofulvin. Part IX. *J. Chem. Soc.*
- Medoff, G., and Kobayashi, G. S. 1983. Mode of Action of Antifungal Drugs. En Fungi Pathogenic for humans and animals. Ed. Howard, D.H. Marcel Dekker, Inc. N. Y.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3): 426-428

Mitard, A., Riba, J. P., 1988. Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates. *Bio-technol. Bioeng.* 32: 835-840

Nyiri, L., and Leugyel, Z. L., 1985 Studies on automatically aerated biosynthetic process. *Biotechnolo. Bioeng.* 7: 343-354

Nona, D. A., Blake, M. I., and Crespi, H. J., 1988. Effect of deuterium oxide on the culturing of *Penicillium janczewskii* III. Antifungal activity of fully deuterated griseofulvin. *J. Pharm. Sci.* 57: 1993

Nordmann, G., Thren, R., and Bärwald, G., 1988. Griseofulvin. British patent 1,132,217.

Odds, F. C., 1991. Potential for penetration of passive barriers to fungal invasions in humans. En *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*, Ed Garry, T. Cole y Harvey C. Hoch. Plenum Press, N.Y.

Onken, U., and Weiland, P., 1985. Control and Optimization. En *Biotechnology Vol. 2: Fundamentals of Biochemical Engineering*, Ed. H.J. Rehm y G. Reed, Verlag-Chemie

Oxford, A. E., Raistrick, H., and Simonart, P. 1939. Studies on the biochemistry of microorganisms. Griseofulvin, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum*. *Dierck Biochem. J.* 33:240
245

Rhodes, A. 1963. Griseofulvin. Production and biosynthesis. *Prog. Ind. Microbiol.* 4: 167

Rhodes, A., and Boothroyd, B., 1961. Biosynthesis of griseofulvin: the methylated benzophenone intermediates. *Biochem. J.* 81: 28

Rhodes, A., Crosse, R., Ferguson, T.P., and Fletcher, D. L., 1957. Improvements in or relating to the production of the antibiotic griseofulvin. British patent 784,618.

Rhodes, A., Crosse, R., and Ferguson, T., 1958. Production of griseofulvin in low nitrogen level medium. U.S. patent 2,843,527.

Rhodes, A., and Mc Gonagle, P. 1963. Griseofulvin production. U.S. patent 3,095,360.

Righelato, R. C., Trinci, A. P., Pirt, S. J., and Peat, A. 1968. Morphology and conidiation of *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.* 50: 399-412

Roth, F. J., 1960. Griseofulvin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 89: 247-253.

Sato, Y., Oda, T. and Uvano, S. 1976. Griseofulvin biosynthesis: New evidence of two acetate dispositions in the ring A from C^{13} nuclear magnetic resonance studies. *Tetrahedron Lett.* 44: 3971

Saval, S. B., 1992. Desarrollo de un proceso fermentativo para la producción de estreptomycin. Tesis de Doctorado. UACPyP/ CCH/ UNAM, Proyecto de Biotecnología.

Saval, S. B., 1992. Comunicación personal. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Schultz, J. S., Reihard, D., and Lind, R., 1960. Statistical methods in fermentation development. Ind. Eng. Chem. 52(10): 827-830

Stanbury, P. F., and Whitaker, A., 1984. Principles of fermentation technology. Pergamon Press Inc., London.

Turner, W. B., 1975. Commercially important secondary metabolites. En "Filamentous fungi" Vol. 1 Industrial Micology. Ed. Smith, J.E. y Berry, D.R., Edward Arnold. London