

03072

$\frac{3}{28}$



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
CIUDAD UNIVERSITARIA

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Postgrado  
del Colegio de Ciencias y Humanidades

Facultad de Química

## FALLA DE ORIGEN

**Optimización de un medio de cultivo para la producción de  
antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius***

### T E S I S

que para obtener el grado de

**Maestro en Biotecnología**

presenta:

**Q.F.B. Gilberto Casillas Pétriz**

México, D.F.

Mayo de 1995



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

**Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel.**

*A Guadalupe Pétriz López  
y Delfino Casillas Díaz,  
mis padres.*

*A Lilia Antonia Vargas León,  
mi compañera.*

*A Rasputin,  
mi inolvidable amigo.*

*Agradezco a los profesores*

*Dr. Sergio Sánchez Esquivel  
Dr. Enrique Galindo Fentanes  
M. en B. Rebeca Ramírez Carrillo  
Dra. Susana Saval Bohórquez  
M. en C. Sergio A. Sánchez Ruiz*

*quienes integraron el jurado de examen para la obtención de mi grado, sus valiosos consejos y su apoyo profesional en el contenido de este escrito.*

*Agradezco especialmente a las siguientes personas:*

*Ing. Gilberto Fabila Carrera  
M. en B. María Teresa Lucas Jiménez  
Biol. Laura Angélica Escalante Dávila*

*por haberme concedido su tiempo, sus conocimientos, su vasta experiencia, y su afable disposición profesional durante el transcurso de mi investigación.*

*"La primera condición que han de cumplir los hombres de ciencia que se dedican a la investigación de los fenómenos naturales consiste en mantener una absoluta libertad de espíritu basada en la duda filosófica. Sin embargo, no hemos de ser escépticos en lo más mínimo, sino que hemos de creer en la ciencia, esto es, en el determinismo; hemos de creer en una relación completa y necesaria entre las cosas, lo mismo en el caso de los fenómenos relativos a los seres vivos que en los demás; pero al mismo tiempo hemos de estar profundamente convencidos de que sólo conocemos esta relación en forma más o menos aproximada, y que las teorías que sustentamos distan mucho de encarnar verdades invariables. Cuando defendemos una teoría general en nuestras ciencias, sólo sabemos, en sentido literal, que todas estas teorías son falsas. No son más que verdades parciales y provisionales que nos son necesarias, a manera de descansos en los que nos afanzamos, para proseguir adelante con la investigación; no representan más que el estado presente de nuestro conocimiento, y por consiguiente habrán de cambiar con el desarrollo de la ciencia, y aún con tanta mayor frecuencia cuanto menos avanzadas estén las ciencias en su evolución."*

**Claude Bernard**

# ÍNDICE

RESUMEN	Página <b>IX</b>
INTRODUCCIÓN	<b>X</b>
OBJETIVOS	<b>XIII</b>
PARTE I	<b>1</b>
1. GENERALIDADES	<b>2</b>
1.1. Antecedentes	<b>2</b>
1.2. Propiedades fisicoquímicas de las antraciclinas	<b>5</b>
1.3. Características de cultivo para la producción de antraciclinas	<b>7</b>
1.4. Mecanismos de acción farmacológica de las antraciclinas	<b>10</b>
1.5. Toxicidad de las antraciclinas	<b>11</b>
1.6. Farmacología de las antraciclinas	<b>12</b>
1.7. Importancia clínica e industrial de las antraciclinas	<b>13</b>
1.8. Biosíntesis de las antraciclinas	<b>14</b>
PARTE II	<b>18</b>
2. MATERIAL, EQUIPO Y MÉTODOS	<b>19</b>
2.1. Condiciones de cultivo	<b>19</b>
2.1.1. Cepa	<b>19</b>
2.1.2. Agua	<b>20</b>
2.1.3. Esterilización	<b>20</b>
2.1.4. Esporulación	<b>20</b>
2.1.5. Matraces	<b>20</b>
2.1.6. Incubación	<b>21</b>
2.1.7. Preinóculo	<b>21</b>
2.1.8. Inóculo	<b>21</b>
2.1.9. Fermentación	<b>22</b>
2.1.10. Muestreo	<b>22</b>

2.2. Métodos analíticos generales	22
2.2.1. Crecimiento	22
2.2.2. Glucosa	23
2.2.3. Amonio	23
2.2.4. Fósforo	24
2.2.5. pH	25
2.2.6. Neutralización de desechos	25
2.3. Métodos de extracción y cuantificación de antraciclinas	25
2.3.1. Extracción de antraciclinas intracelulares	25
2.3.2. Extracción de antraciclinas extracelulares	26
2.3.3. Cromatografía en capa fina	26
2.4. Métodos estadísticos	27
2.4.1. Parámetros estadísticos básicos	27
2.4.2. Análisis de la variancia	28
2.4.3. Prueba de homogeneidad de Bartlett	31
2.4.4. Prueba de comparación apareada de Tukey	32
2.4.5. Diseño experimental y algoritmo de Yates	33
2.4.6. Análisis de correlación multivariable por cálculo matricial	35
PARTE III	38
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1. Experimentos de optimización variando un factor a la vez	39
3.1.1. Fermentación <i>inicial</i>	39
3.1.2. Evaluación de la concentración de la levadura de cerveza	45
3.1.3. Evaluación de la concentración de las sales minerales	50
3.1.4. Evaluación de la concentración de la glucosa	52
3.1.5. Medio de fermentación modificado	56
3.2. Desarrollo del diseño experimental	56
3.2.1. Diseño factorial fraccionado	56
3.2.2. Análisis de correlación multivariable	58
3.2.3. Modelo matemático de la producción de antraciclinas por <i>Streptomyces peucetius</i> variante <i>caestus</i>	59
3.2.4. Diagrama cuboidal	63



3.3. Consideraciones finales sobre el medio de producción optimizado	65
3.3.1. Costo del medio de producción optimizado	65
3.3.2. Trascendencia del pH sobre la producción de antraciclinas	66
3.3.3. Cuantificación de doxorrubicina	68
CONCLUSIONES	69
REFERENCIAS	71

## Optimización de un medio de cultivo para la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius*

### RESUMEN

Las antraciclinas son un grupo de compuestos que se caracterizan, principalmente, por presentar una importante actividad antitumoral. Actualmente, la doxorubicina, la daunorubicina, la carminomicina y la aclacinomicina, son las antraciclinas de mayor uso terapéutico en el tratamiento contra el cáncer. La producción de estos compuestos ha sido reportada entre 5 y 15  $\mu\text{g/l}$ , por lo que resultó atractivo incrementar su producción mediante un proceso de optimización del medio de cultivo en el cual se producen.

Para ello, durante la presente investigación, se utilizó una mutante de *Streptomyces peucetius* denominada como variante *caesius*.

Durante la optimización se establecieron las condiciones fisicoquímicas para incrementar la producción de antraciclinas en un medio de cultivo cuyos componentes tienen grado industrial.

Una vez que se establecieron las condiciones, se aplicó un diseño experimental factorial fraccionado para estudiar los efectos de los nutrientes del medio sobre la producción. A partir del diseño, se obtuvieron coeficientes de correlación y de regresión con los cuales se determinó la influencia estadística de cada uno de los factores (nutrientes) sobre la respuesta (producción). Posteriormente, se definió el modelo matemático que mejor explicó el proceso de producción, y esto dio origen a superficies de respuesta que expresan gráficamente el comportamiento del sistema.

A lo largo de la optimización, la producción llegó a incrementarse hasta más de 38 veces sobre la obtenida en el medio de cultivo original, reduciendo en 50% el costo del medio. La glucosa, la levadura de cerveza, y el  $\text{CaCO}_3$  fueron los factores más influyentes sobre la producción de antraciclinas.

Del proceso fermentativo se derivó un modelo matemático lineal, por lo que el efecto de cada nutriente sobre la producción fue independiente de los demás.

Gilberto Casillas Pétriz

# INTRODUCCIÓN

Konrad Seitz\*, director del Departamento de Planificación Estratégica del Ministerio del Exterior de Alemania, sostiene que para pertenecer al grupo de las naciones denominadas "del primer mundo" existe una sola condición: dominar, por lo menos, una de las tecnologías que constituyen la clave del futuro mercado mundial. Tales tecnologías son: la informática, la tecnología espacial, las nuevas energías, los nuevos materiales, y la biotecnología. Según Noam Chomsky, es esta última la más importante y, por adición, la que se encuentra al alcance inmediato de muchos de los países catalogados como "tercermundistas".

México es un país en vías de desarrollo y privilegiado por la vastedad de sus recursos naturales; no obstante, subraya Rodolfo Quintero\*\*, en tan solo dos décadas "pasó de ser el país con la industria biotecnológica más desarrollada de América Latina, a colocarse como importador de productos de la biotecnología moderna elaborados en otros países de la región". Una de las causas de tal retroceso, de acuerdo con el Dr. Quintero, ha sido la desigualdad en la evolución biotecnológica nacional. Mientras que académicamente se ha mantenido un liderazgo en Latinoamérica con programas de investigación de reconocida calidad nacional e internacional, industrialmente existe un rezago gradual propiciado, en parte, por una visión errática hacia los beneficios de la biotecnología tanto de los organismos financieros nacionales como del círculo político gubernamental.

Ante este panorama, se ha originado una brecha cada vez más difícil de franquear en el vínculo entre las instituciones universitarias y la industria. El estudio de la biotecnología dentro del *campus* carece de sentido si se encuentra relegado de su ejercicio en las plantas industriales, especialmente cuando la investigación académica se ha encumbrado en un elitismo científico cuyos intereses distan bastante de las perspectivas empresariales y de las necesidades reales de la sociedad. No debemos olvidar que la biotecnología se define como el conjunto de conocimientos, métodos, procesos y equipo cuyas aplicaciones tienen la finalidad de producir bienes y servicios que satisfagan las necesidades básicas de las comunidades, valiéndose para ello del material biológico proveniente de diversas especies animales, vegetales y microbianas.

En México es imperante, actualmente, elevar el desarrollo biotecnológico global, impulsado por las universidades e instituciones educativas de nivel superior, y acelerado por proyectos de investigación destinados a satisfacer, cuanto antes, las demandas prioritarias de nuestra sociedad. Solamente así se puede atraer la atención de los diversos círculos empresariales, y lograr la inclusión de los programas de desarrollo biotecnológico dentro de la planeación política gubernamental. El financiamiento de investigaciones estancadas en la generación de conocimiento estéril que únicamente satisface la curiosidad del investigador o cuya viabilidad productiva sea vislumbrada a largo plazo, es una excentricidad que no debe tener cabida en la idiosincrasia de una nación en vías de desarrollo.

\* Referido por el Dr. Heinz Dieterich Steffan durante la presentación del Primer Simposio de Biotecnología Cubana en México, que se llevó a cabo del 6 al 9 de septiembre de 1994 en la Cámara Nacional de la Industria de la Transformación, y en la Universidad Autónoma Metropolitana Plantel Xochimilco, en el Distrito Federal, México.

\*\* Entrevista realizada al Dr. Rodolfo Quintero Ramírez por José de Jesús Guadarrama H., y publicada en el periódico *El Financiero* el 24 de agosto de 1994.

El trabajo realizado durante esta investigación, es un reflejo del esfuerzo constante que se está llevando a cabo en México en los postgrados en biotecnología para reivindicar nuestro nivel académico de excelencia, formando profesionales comprometidos con la investigación científica nacional, tanto académica como industrial, frente a las naciones que marcan el rumbo a seguir dentro de esta disciplina.

El término *optimización* es bien conocido dentro de los ámbitos científico y tecnológico; sin embargo, los procedimientos estadísticos para conseguir exitosamente los fines que se persiguen en cualquier proceso de optimización son poco comprendidos, desdeñándose, con frecuencia, su potencial real como elementos metodológicos.

Hablar de optimización en las diferentes escalas productivas, implica tener en consideración varios aspectos: primero, adoptar un modelo de producción ya probado para asumir la viabilidad de su mejoramiento; segundo, elegir el procedimiento más adecuado o, en su defecto, el mejor conocido por el investigador para cumplir dicha tarea; y por último, contar no sólo con el conocimiento teórico-práctico acerca del objeto de transformación, sino también con una consciencia crítica del sujeto que investiga que le confiera flexibilidad a la aparente inmutabilidad de los números expresados en promedios, sumatorias, coeficientes, unidades de variación, modelos matemáticos y, en general, a toda la gama de algoritmos que necesariamente se derivan durante el desarrollo de un proceso de optimización con elementos estadísticos.

Siguiendo en esta línea de pensamiento, la parcela de la realidad que se optó por estudiar fue la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius* en un medio de cultivo basado en el que Federico Arcamone y sus colaboradores desarrollaron para el aislamiento de la doxorubicina por este mismo microorganismo [1, 43].

El estudio de las antraciclinas resulta muy atractivo ya que sus propiedades antitumorales las han colocado en un lugar preponderante dentro de la quimioterapia contra el cáncer. La doxorubicina es la antraciclina que ha recibido mayor atención por parte de los investigadores, debido a su comprobada eficacia clínica y su relativa seguridad, ya que la restricción principal para el uso de los compuestos antraciclínicos es su elevada toxicidad para las células normales. Aunado a lo anterior, las antraciclinas de mayor uso terapéutico (la doxorubicina y la daunorrubicina) no son fáciles de obtener, por lo que su valor, no solo en términos de costos sino también como objeto de investigación, se ha visto incrementado. Desde el descubrimiento de la daunorrubicina en 1963, y el de la doxorubicina seis años después, la producción mundial de ambos compuestos se encuentra monopolizada por las empresas Farmitalia Carlo Erba (Italia, Alemania y Reino Unido) y Rhône-Poulenc (Francia), por lo que resulta muy difícil definir los puntos críticos del proceso para su producción, inmersos en la reserva que el dominio del mercado exige.

Se ha investigado mucho acerca de las antraciclinas, especialmente sobre sus propiedades terapéuticas, sus mecanismos de acción farmacológica, mutagénesis de los organismos productores, condiciones de cultivo, biosíntesis y bioconversión, pero no existen antecedentes sobre la optimización de la producción de dichos compuestos. Es así que esta investigación se conjuntó con dos fases globales de desarrollo. La primera, consistió en la delimitación teórica y metodológica para el estudio de la producción de antraciclinas y de las posibles interrelaciones entre factores y respuestas. La fase siguiente abarcó todos los experimentos, tanto simples como combinados, que fueron necesarios para establecer las mejores condiciones nutricionales con las cuales se incrementaría y evaluaría la producción de antraciclinas. Durante la etapa experimental, se aplicaron definiciones, conceptos, y métodos estadísticos que guiaron los criterios de decisión hacia los objetivos planteados. Con ello se pretende aclarar la intención de esta investigación, y que puede traducirse sencillamente como el uso de herramientas estadísticas básicas y avanzadas, en un estudio de optimización dentro de un proceso biotecnológico.

Uno de los puntos más interesantes del proceso fermentativo estudiado en el presente trabajo, fue la dilucidación de un modelo matemático predictor para la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius* basada en la significancia estadística de los factores nutricionales evaluados durante todo el estudio.

Por todo lo expuesto anteriormente, la optimización de un medio de cultivo para la producción de antraciclinas adquiere una gran importancia en el sentido de que no existen datos formales publicados al respecto. Así, los resultados y conclusiones que se infieren de esta investigación cumplen con el propósito de asentar algunos de los factores de cultivo que son determinantes en la producción de los compuestos antraciclínicos.

Dado que el desarrollo de este trabajo se ubicó en un laboratorio universitario de "microbiología industrial", resulta obvio que el sentido dado a esta investigación tenga un enfoque académico cuya evaluación, *in extenso*, le permita adquirir una connotación tecnológica, más que a la producción de antraciclinas, a la correcta aplicación del criterio empírico sustentado en elementos estadísticos a lo largo de un proceso productivo biotecnológico.

## OBJETIVOS

---

1. Incrementar la producción de antraciclinas, en matraces, variando las concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo.
  2. Definir el modelo matemático que explique el proceso de producción de antraciclinas, por *Streptomyces peucetii* variante *caesius*, mediante un diseño factorial fraccionado.
-

## ***PARTE I***

---

*“Si los hechos puestos como base del razonamiento  
están mal establecidos o son erróneos,  
todo se vendrá abajo o resultará falsificado;  
y es así como los errores de las teorías científicas  
tienen su origen,  
las más de las veces,  
en errores de hecho.”*

*Claude Bernard*

---

# 1. GENERALIDADES

## 1.1. Antecedentes.

Las antraciclinas constituyen un grupo de antibióticos que, debido a que algunos de ellos exhiben una extraordinaria actividad antitumoral, han sido el foco de atención de muchos investigadores con la finalidad de aportar elementos de síntesis, regulación, producción, y aplicación de estos compuestos en el tratamiento quimioterapéutico del cáncer. Estos antibióticos se encuentran entre los primeros conocidos, desde 1939 [34].

La primer antraciclina descrita detalladamente, en 1950, fue la  $\beta$ -rhodomicina I producida por *Streptomyces purpurescens*, que presentaba una fuerte actividad antibacteriana, pero su uso clínico fue limitado debido a su alta toxicidad. Posteriormente, en 1959, se obtuvieron las cinerubinas A y B pero su alta toxicidad restringió definitivamente su aplicación clínica como antibacterianos, antimicóticos y anticancerígenos [32, 50].

La primera antraciclina con efectividad clínica fue aislada, entre 1962 y 1963, por tres grupos de investigación independientes. En Francia, investigadores de Rhône-Poulenc la obtuvieron con cepas de *Streptomyces coeruleorubidus*, y la llamaron rubidomicina. En Italia, fueron los investigadores de Farmitalia quienes con cepas de *Streptomyces peucetius* obtuvieron el antibiótico al que llamaron daunomicina. Y en la ya desintegrada Unión Soviética se aisló el compuesto que fue denominado rubomicina, empleando, igualmente, cepas de *Streptomyces peucetius*. De los tres nombres se derivó el nombre genérico actual del antibiótico que es daunorrubicina [5, 32, 39, 50].

Aunque es altamente tóxico (toxicidad común en las antraciclinas), la daunorrubicina mostró una actividad muy interesante en contra de varios tipos de cáncer experimentales en animales y, posteriormente, en cánceres humanos. Así, se observó que tiene un potencial de acción muy grande en contra de leucemias infantiles y de tumores sólidos, siendo el primer fármaco que dió una considerable remisión inducida en el tratamiento de estos padecimientos hasta el grado de lograr una recuperación completa en algunas leucemias agudas que, hasta el descubrimiento de esta antraciclina, siempre fueron letales [5, 25, 39, 50].

La doxorubicina, también llamada adriamicina, fue descubierta varios años más tarde, en 1969, por Federico Arcamone y sus colaboradores, a partir de una mutante de *Streptomyces peucetius* identificada como variante *caesius*. Estructuralmente, se encuentra estrechamente



relacionada a la daunorrubicina; sin embargo, se observó que además de tener un índice terapéutico superior al de la daunorrubicina, poseía actividad para un más amplio espectro de tumores y, además, una toxicidad disminuida. Actualmente, es el agente antineoplásico de origen microbiano más utilizado clínicamente [3, 5, 12, 17, 25, 30, 32, 41, 50].

**Tabla 1.1.1. Microorganismos productores de antraciclinas.**

<b>Antraciclinas</b>	<b>Cepas productoras</b>
Ácido aklanónico	<i>Streptomyces</i> sp.
Ácido figaroico	<i>Streptosporangium</i> sp.
Aclacinomicina	<i>Streptomyces galileus</i> <i>Streptomyces peucetius</i> <i>Streptomyces</i> sp.
Aklavina	<i>Streptomyces echinatus</i>
Arenciamicina	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>
Baumicina	<i>Streptomyces</i> sp.
Beromicina	<i>Streptomyces griseoruber</i> variante <i>beromycini</i>
Carminomicina	<i>Actinomadura carminata</i> <i>Streptomyces peucetius</i> <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> <i>Streptomyces capoarnus</i>
Ciclacidina	<i>Streptomyces capoarnus</i>
Ciclamicina	<i>Streptomyces cinereoruber</i> variante <i>fructofermentans</i>
Cinerubina	<i>Streptomyces bellus</i> variante <i>cirolerosus</i>
Cirolemicina	<i>Streptomyces griseoflavus</i>
Cítotetrina	<i>Streptomyces peucetius</i>
Daunorrubicina	<i>Streptomyces peucetius</i> variante <i>caesius</i> <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> <i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces griseus</i> variante <i>rubidofaciens</i> <i>Streptomyces bifurcus</i> <i>Streptomyces insignis</i> <i>Streptomyces griseoruber</i> <i>Streptomyces viridochromogenes</i> <i>Streptomyces</i> sp.
Daunosaminil-Daunorrubicina	<i>Streptomyces peucetius</i> variante <i>carneus</i>
13-Desoxicarminomicina	<i>Streptomyces peucetius</i> variante <i>carminatus</i>
11-Desoxidaunorrubicina	<i>Streptomyces peucetius</i> variante <i>aureus</i> <i>Micromonospora</i> sp.
11-Desoxidoxorrubicina	<i>Streptomyces peucetius</i> variante <i>aureus</i> <i>Micromonospora</i> sp.
11-Desoxi-13-Desoxidaunorrubicina	<i>Micromonospora</i> sp.
11-Desoxi-4-O-Desmetildaunorrubicina	<i>Streptomyces peucetius</i> variante <i>aureus</i>
11-Desoxi-4-O-Desmetiloxorrubicina	<i>Streptomyces peucetius</i> variante <i>aureus</i>
11-Desoxi-4-O-Desmetil-13-Dihidrodaunorrubicina	<i>Streptomyces peucetius</i> variante <i>aureus</i>
11-Desoxi-13-Dihidrodaunorrubicina	<i>Micromonospora</i> sp.
13-Dihidrodaunorrubicina	<i>Streptomyces peucetius</i> variante <i>carneus</i>
Doxorrubicina	<i>Streptomyces peucetius</i> variante <i>caesius</i>
Eloramicina	<i>Streptomyces glaucescens</i>
Ericamicina	<i>Streptomyces olivaceus</i> <i>Streptomyces</i> sp.

(Continúa)

**Tabla 1.1.1. Microorganismos productores de antraciclinas (continuación).**

Antraciclinas	Cepas productoras
Galirubina	<i>Streptomyces galliaeus</i>
Isohodomicina	<i>Streptomyces purpurascens</i>
Lateriomicina	<i>Streptomyces griseoruber</i>
Leucemomicina	<i>Streptomyces griseus</i>
Maggiomicina	<i>Streptomyces</i> sp.
Marcelomicina	<i>Actinosporangium</i> sp.
Marimicina	<i>Streptomyces mariensis</i>
Micetina	<i>Streptomyces janthinus</i>
	<i>Streptomyces violans</i>
	<i>Streptomyces</i> sp.
Miniatomicina	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>
Mitocromina	<i>Actinosporangium</i> sp.
Musettamicina	<i>Nocardia narashinoensis</i>
Nocardorrubina	<i>Streptomyces nogalator</i>
Nogalamicina	<i>Streptomyces flavovirens</i>
Pilaromicina	<i>Streptomyces galliaeus</i>
Pirromicina	<i>Streptomyces</i> sp.
	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Quinociclina	<i>Streptomyces filamentosus</i>
Requinomicina	<i>Streptomyces olindensis</i>
Retamicina	<i>Streptomyces rubrirciculi</i>
Reticulomicina	<i>Streptomyces griseus</i>
Rhodomicetina	<i>Streptomyces galliaeus</i>
Rhodorrubina	<i>Streptomyces purpurescens</i>
Rhodomicina	<i>Streptomyces ryensis</i>
Riemicina	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>
Rubomicina	<i>Streptomyces</i> sp.
Rutilantina	<i>Streptomyces steffiebergensis</i>
Steffimicina	<i>Streptomyces tauricus</i> nov. sp.
Tauromicetina	<i>Streptomyces glaucescens</i>
Tetracenomicina C	<i>Streptomyces olivaceus</i>
	<i>Streptomyces diastochromogenes</i>
Tripanomicina	<i>Actinomyces</i> sp.
Vacunocidina	<i>Actinomyces</i> sp.
Violacina	<i>Macrospora violacea</i>
	<i>Streptomyces violaceus</i>
Violamicina	<i>Streptomyces violaceus</i>
Violarina	<i>Streptomyces coelicolor</i>

Recopilado de [4; 29; 30; 32; 50]

En 1974, fue descubierta la carminomicina, estrechamente relacionada en su estructura con la daunorrubina y la doxorrubina. Su descubrimiento ocurrió en Rusia y el microorganismo del que se aisló fue *Actinomadura carminata* [32, 50].

En Japón, en 1979, se obtuvo la aclacinomicina A con cepas de *Streptomyces galilaeus*, aunque también es producida por *Streptomyces peucetius* [29, 32].

Estas últimas cuatro antraciclinas son, actualmente, las que han sido aprobadas para su uso clínico en el tratamiento de múltiples tipos de cáncer. No obstante, desde 1988 se han

identificado más de 400 antraciclinas diferentes, de las cuales aproximadamente la mitad son producidas de manera natural, principalmente, por varias especies de actinomicetos [22, 28, 32].

Todas estas antraciclinas poseen una elevada actividad antitumoral pero su citotoxicidad es lo que impide que tengan una aplicación clínica confiable. Es por eso que la mayoría de los esfuerzos realizados en las investigaciones acerca de estos compuestos, están enfocados en la obtención de fármacos más eficientes que los ya aprobados y con un grado de toxicidad aún menor. Además de las especies silvestres de actinomicetos, se han utilizado especies mutantes, ya sea para la obtención de nuevas antraciclinas o para incrementar la producción de las ya conocidas. En la tabla 1.1.1. se enlistan algunos de los principales productos antraciclínicos que se conocen y las cepas de microorganismos silvestres y mutantes de las que se han aislado.

Como puede observarse, los compuestos derivados de la daunorrubicina (entre ellos la doxorubicina y la carminomicina) componen la mayor proporción entre los compuestos antraciclínicos conocidos hasta ahora. El éxito de la daunorrubicina y, posteriormente, de la doxorubicina, particularmente en el tratamiento clínico de tumores sólidos, despertó el interés en el aislamiento de antibióticos relacionados con ellas, así como en la síntesis de análogos estructurales y derivados [4].

Desde 1974, la doxorubicina ha sido la antraciclina más estudiada en diversas áreas de investigación. Ha sido evaluada en sus efectos terapéuticos, tanto independientemente como en su interacción con otros fármacos, sin perder de vista los efectos tóxicos que son inherentes a sus mecanismos de acción. También se ha utilizado como punto de partida para la síntesis de análogos estructurales que tengan una actividad antitumoral mejor y con menos efectos tóxicos. En este aspecto han sido determinantes algunos estudios químicos y de bioconversión. Sin embargo, actualmente la doxorubicina junto con la daunorrubicina siguen siendo los antineoplásicos de mayor demanda y su producción se encuentra controlada principalmente por las empresas Farmitalia Carlo Erba (Italia, Reino Unido y Alemania) y Rhône-Poulenc (Francia), respectivamente [2, 12, 32, 47, 50].

## 1.2. Propiedades fisicoquímicas de las antraciclinas.

El término antraciclinas es el nombre genérico propuesto por Hans Brockmann para un grupo de cromoglucósidos derivados de la aglicona 7,8,9,10-tetrahidro-5,12-naftaceno quinona. Tanto las antraciclínicas como sus glucósidos son pigmentos cuya coloración varía desde el amarillo hasta el púrpura, predominando el anaranjado y el rojo. Esta característica se debe a la presencia de un cromóforo de polihidroxiantraquinona presente en el esqueleto del 7,8,9,10-tetrahidro-5,12-naftaceno [2, 22, 25, 29, 32, 34]. En la figura 1.2.1. se esquematiza el esqueleto básico de carbono de las antraciclínicas. La numeración y la designación de los anillos fueron propuestos por Brockmann en 1963. Los anillos son identificados con las letras A, B, C, y D iniciando con el anillo alicíclico, aunque algunos autores prefieren comenzar en el anillo del extremo izquierdo de la fórmula estructural [2, 5, 22, 34]. Todas las antraciclínicas presentan la misma configuración en la que el grupo químico substituyente en el carbono 7 se encuentra en una posición *trans* en relación con el substituyente del carbono 10. Puesto que las antraciclínicas no deshidratadas poseen dos o tres centros quirales en el anillo A (específicamente los carbonos 7, 9 y 10) pueden existir, teóricamente, cuatro u ocho estereoisómeros.

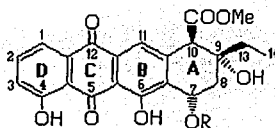


Figura 1.2.1. Esqueleto de carbono de las antraciclinaonas.

Hasta ahora, no se conoce alguna antraciclina que se encuentre substituida en el carbono 3. Por otra parte, los carbonos 1, 4, 6, 7 y 11 son substituidos, salvo algunas excepciones, por grupos hidroxilo. En los carbonos 2 y 4 pueden encontrarse grupos metoxilo, mientras que en la mayoría de las antraciclinaonas una molécula de azúcar (mono, di, o trisacárido) se une en el carbono 7, aunque en otros casos la unión ocurre en el carbono 10, y con menos frecuencia en ambas posiciones simultáneamente. Cuando la molécula de azúcar no se encuentra unida en el carbono 10, el substituyente de esta posición es, generalmente, un grupo carbometoxilo o hidroxilo. El carbono 8 casi no sufre substitución, excepto en el caso de la steffimicina en donde se encuentra un grupo metoxilo. La cadena lateral carbonada en la posición 9 puede variar en su longitud a partir de grupos metilo o isobutilo, dependiendo de la unidad iniciadora acoplada para la formación del decaácido precursor común durante la biosíntesis de las antraciclinaonas (véase la sección 1.8.). Estos substituyentes pueden ser  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{COCH}_3$ ,  $-\text{COCH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CHOHCH}_3$ ,  $-\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ , y  $-\text{CH}_2\text{COCH}_3$ . El grupo hidroxilo del carbono 9 es característico en casi todos los compuestos antraciclínicos [2, 22, 25, 28, 34].

Entre los azúcares que forman parte de la estructura de las antraciclinaonas, la daunosamina es la más común entre los grupos de la daunorrubicina y de la carminomicina, mientras que la rhodosamina, la 2-desoxifucosa y las cinerulosas se encuentran en los grupos de la aclacinomicina, de la pirromicina y de la rhodomicina [5, 25, 29]. En la figura 1.2.2. se puede observar la estructura del glucósido doxorubicina, en donde el aminoazúcar daunosamina se une al carbono 7 de la doxorubicinona mediante un enlace éter [3, 11, 24, 27, 48, 50].

Muchas de las antraciclinaonas son pigmentos intracelulares que pueden ser extraídos con mezclas de disolventes como  $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OH}$ - $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ ,  $\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{OH}$ , y  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ - $\text{H}_2\text{SO}_4$ . En el mismo extracto, pueden ser cuantificados espectrofotométricamente por absorbancia a 495 nm, calculando la concentración con una absorbtividad de 220 (1 %, 1cm). La mayoría de las antraciclinaonas poseen una capacidad de absorción similar, ya que es la estructura tetracíclica con sus regiones resonantes la que les confiere dicha característica. Es por ello que los extractos, en donde pueden encontrarse varios compuestos antraciclínicos, producen básicamente la misma respuesta frente al haz de luz del espectrofotómetro. Estos pigmentos tienen, además, la particularidad de comportarse como indicadores ácido-base; tienden a virar su coloración hacia amarillo o anaranjado con valores de pH ácidos; hacia anaranjado o rojo cuando el pH es neutro; y a púrpura o azul-violeta si el pH es alcalino (con descomposición del glucósido). [3, 19, 24].

En general, los microorganismos productores de antraciclinaonas no producen un solo derivado, sino una mezcla de compuestos antraciclínicos cuyo número varía de un organismo a otro. Así, de *Streptomyces peucetius*, productor de la daunorrubicina, pueden extraerse hasta 20 antraciclinaonas estrechamente relacionadas entre sí [50].

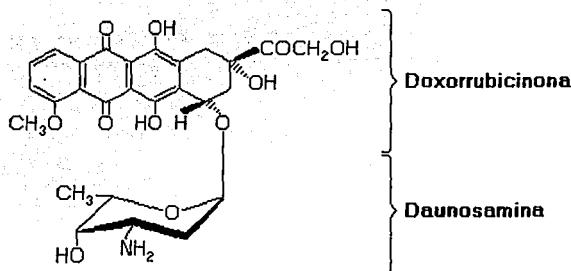


Figura 1.2.2. Doxorubicina.

### 1.3. Características de cultivo para la producción de antraciclinas.

Hablar de las características y condiciones de cultivo para la producción de antraciclinas, obliga a hacer referencia a aquellas especificadas para la producción de daunorrubicina y doxorubicina, ya que son las antraciclinas más utilizadas de las cuatro que han sido aprobadas para su aplicación clínica y, por lo tanto, las que más han sido estudiadas sobre su producción por la vía fermentativa. Por cierto, es necesario hacer notar que tales condiciones son básicamente las mismas en todos los estudios realizados desde los años 60's, época en que las antraciclinas cobraron una inusitada importancia clínica.

Normalmente, los microorganismos productores de daunorrubicina y sus derivados, forman colonias rojas en agar debido a la acumulación de los pigmentos antraciclínicos. La misma pigmentación ocurre en medios de cultivo líquidos, en donde estos antibióticos se encuentran presentes, principalmente, en la masa micelial del microorganismo productor. Extracelularmente, la presencia de antraciclinas es ínfima [2, 3, 19, 50].

*Streptomyces peucetius* es uno de los microorganismos más importantes en la síntesis y producción de antraciclinas. Este actinomiceto fue aislado en 1957 de una muestra del suelo de Peucetia, una de las dos regiones en que se dividía Apulia, comarca de la antigua Italia, actualmente llamada Pulla. Esta cepa fue seleccionada durante un programa de tamizado (*screening*) antibacteriano y antimicótico (aunque el procedimiento que se utilizó aún no está claro), en los laboratorios Farmitalia Carlo Erba, en Milán, Italia. Durante su crecimiento mostró tener actividad contra bacterias grampositivas y contra hongos. *Streptomyces peucetius* suele presentar una variabilidad natural reflejada en la heterogeneidad de fenotipos como puede observarse en la tabla 1.3.1. [29, 50].

De los diferentes grupos de cepas obtenidos con *Streptomyces peucetius*, es el grupo I el que ha sido más explotado desde 1963, año en que fue descubierta la daunorrubicina. Sin embargo, esta antraciclina se obtiene después de una hidrólisis ácida de los glucósidos conocidos como baumicinas A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, presentes al final de la fermentación. A las cepas silvestres las caracteriza su baja producción de antraciclinas, de ahí que al observarse la importante actividad antitumoral de estos compuestos, se intensificaron los esfuerzos para incrementar el rendimiento de la

Tabla 1.3.1. Variabilidad natural de *Streptomyces peucetius* en agar.

Grupos de cepas	Color de los pigmentos antraciclínicos	Color del micelio	Presencia de micelio aéreo	Presencia de esporas
I	anaranjado	rojo intenso	blanquecino (escaso)	verdeazuladas
II	amarillo	de amarillo a rojo	ausente	ausentes
III	anaranjado	amarillo	ausente	ausentes
IV	púrpura	púrpura	blanquecino	ausentes
V	ausente	rosa	ausente	ausentes
VI	anaranjado	púrpura intenso	blanquecino	ausentes
VII	de anaranjado a violeta	púrpura intenso	blanquecino	ausentes

Tomado de [18].

mezcla de antibióticos antraciclínicos (específicamente de la daunorrubicina) y, por otra parte, se realizaron análisis cualitativos para detectar, entre todas las antraciclinas producidas por *Streptomyces peucetius*, análogos con propiedades terapéuticas superiores. Una de las estrategias que se proyectaron para incrementar la producción de la daunorrubicina, fue la selección de mutantes obtenidas a partir de las cepas del grupo I de *Streptomyces peucetius*. Se emplearon varios mutágenos químicos y físicos, y las poblaciones sobrevivientes fueron evaluadas con base en su morfología colonial y en su pigmentación. De estos ensayos se obtuvo la cepa mutante denominada variante *caesius* que es el microorganismo productor de doxorubicina, utilizando como agente mutagénico al compuesto nitrosometiluretano [29, 39, 50]. En la tabla 1.3.2. se presenta, de manera general, la formulación de los medios de cultivo usados para *Streptomyces peucetius*.

Como es de suponerse, la formulación de los medios varía dependiendo de la cepa con la que se esté trabajando, y del producto que se desee obtener. Así, por ejemplo, se han probado diversas fuentes de carbono como almidón, dextrina, maltosa y fructosa; y otros nutrientes como peptona, harina de semillas de algodón, extracto de malta, y harina o aceite de soya.

Además, algunas sales minerales como el nitrato de calcio y de sodio, o aminoácidos como la asparagina, y soluciones vitamínicas, han sido incluidos en los diversos medios de preservación, crecimiento y producción en donde es cultivado *Streptomyces peucetius*. Este microorganismo, como la mayoría de los actinomicetos, está sujeto a regulaciones por catabolitos (como las fuentes de nitrógeno y de fosfato, mediante mecanismos de represión e inhibición, respectivamente). De manera algo excepcional, la glucosa en altas concentraciones no ejerce represión catabólica sobre la síntesis de antraciclinas (como podría esperarse) en *Streptomyces peucetius*; sino que puede presentarse una inhibición ocasionada por los ácidos orgánicos provenientes del metabolismo de la hexosa, excretados al medio por el actinomiceto.

La temperatura de incubación puede ser mantenida entre 25 y 30°C, aunque parece preferible mantenerla entre 27 y 29°C, y el pH del medio debe fluctuar entre 6.40 y 7.30, ya que la acidogénesis en el medio de cultivo (generalmente estimulada por glucosa) afecta enormemente tanto el crecimiento del microorganismo como la producción de antraciclinas.

Cuando el medio de cultivo es líquido, las velocidades de agitación en matraces pueden ir desde 120 hasta 250 rpm, y los tiempos de incubación suelen variar desde 2 hasta 10 días dependiendo del proceso de cultivo que se esté llevando a cabo [3, 18, 19, 20, 35, 50].

Tabla 1.3.2. Medios de cultivo usados para *Streptomyces peucetius*.

Componente del medio	CONCENTRACIÓN (%)			
	Medio de aislamiento	Medio de conservación	Medio de germinación	Medio de producción
Glucosa	3			6
Sacarosa		2	3.6	
Licor de maíz		1	2.4	
Levadura de cerveza	1.5			3
NaCl	0.1			0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05	0.4		0.1
CaCO <sub>3</sub>	0.1	0.4	0.9	0.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0.2	0.24	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.005			0.01
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0005			0.001
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0005			0.001
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0005			0.001
Agar	2	2		

Todos los medios se preparan con agua corriente.

Tomado de [29, 30].

La máxima concentración de antraciclinas no puede definirse en un tiempo constante, ya que ello depende de la cepa, de las condiciones de cultivo y del antibiótico antraciclínico que se quiere obtener. Por ejemplo, se han reportado dos diferentes tiempos para la máxima producción de doxorubicina por *Streptomyces peucetius* variante *caesius* (4 y 6 días), en donde la diferencia parece estribar en algunas condiciones de cultivo [3, 50].

El cultivo de *Streptomyces peucetius* para la producción de daunorrubicina se ha desarrollado en fermentadores de hasta 10 000 litros, mientras que para la variante *caesius* se ha reportado el uso de fermentadores de 800 litros. Los títulos para la producción de daunorrubicina y doxorubicina que se citan en la literatura de patentes se encuentran entre 60 y 70 µg/ml para daunorrubicina, y entre 5 y 15 µg/ml para doxorubicina. Se ha llegado a estimar que la producción industrial de estos fármacos por parte de Farmitalia Carlo Erba y Rhône-Poulenc puede ir desde 500 hasta 1000 µg/ml, sin embargo no existen índices de producción publicados por estas empresas que corroboren dichas estimaciones [35, 50].

En 1969, Federico Arcamone y sus colaboradores [3] establecieron las condiciones fisicoquímicas propicias para el cultivo de la cepa *caesius*. Desde entonces, la base de la formulación del medio de cultivo para la producción de doxorubicina, prácticamente, no ha cambiado. En el grupo de investigación del Laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, se han realizado fermentaciones con *Streptomyces peucetius* variante *caesius* en diferentes medios de cultivo. Sin embargo, entre los medios complejos probados, el propuesto por Arcamone y su grupo es el que ha reeditado los mejores resultados (datos no publicados). Dicho medio se compone, en g/l, de: glucosa, 60; levadura de cerveza, 25; NaCl, 2; CaCO<sub>3</sub>, 2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; MgSO<sub>4</sub>, 0.1; FeSO<sub>4</sub>, 0.01; y ZnSO<sub>4</sub>, 0.01.

#### 1.4. Mecanismos de acción farmacológica de las antraciclinas.

Los mecanismos de acción de las antraciclinas sobre las células, explican tanto las propiedades antitumorales de estos fármacos, como sus efectos tóxicos. La daunorrubicina y, más específicamente, la doxorrubicina, son los fármacos antraciclínicos que han servido como modelo para comprender la actividad biológica de estos compuestos. Dicha actividad está relacionada con su capacidad para enlazarse específicamente con el ácido desoxirribonucleico (ADN), intercalándose entre pares de bases adyacentes de la estructura de la doble hélice, aunque algunos investigadores han observado que las antraciclinas expresan una gran afinidad por los polinucleótidos que siguen una secuencia alternada de purinas y pirimidinas en cada una de las hebras. Cuando la interacción ocurre, se generan desórdenes estereoquímicos entre las hebras del ADN interfiriendo con la función del ácido nucleico como molde progenitor durante su replicación, y durante el evento de la transcripción. La intercalación consiste en la formación de un complejo entre el esqueleto plano de la antraciclina y los polidesoxirribonucleótidos, impidiendo la síntesis del ADN y del ácido ribonucleico (ARN). El ADN sufre un desenrollamiento local de la doble hélice a consecuencia de la separación de las bases apiñadas por la molécula intercalada. El complejo formado es metacromático y sensible a incrementos de la fuerza iónica, así como a las variaciones de temperatura; al mismo tiempo que eleva la viscosidad del medio. Finalmente, ocurre un rompimiento de las hebras monocatenarias con la consecuente fragmentación del polímero. En la figura 1.4.1. se ilustra la intercalación de la doxorrubicina en un segmento del ADN [2, 5, 12, 24, 26, 27, 32, 41, 43, 50, 51].

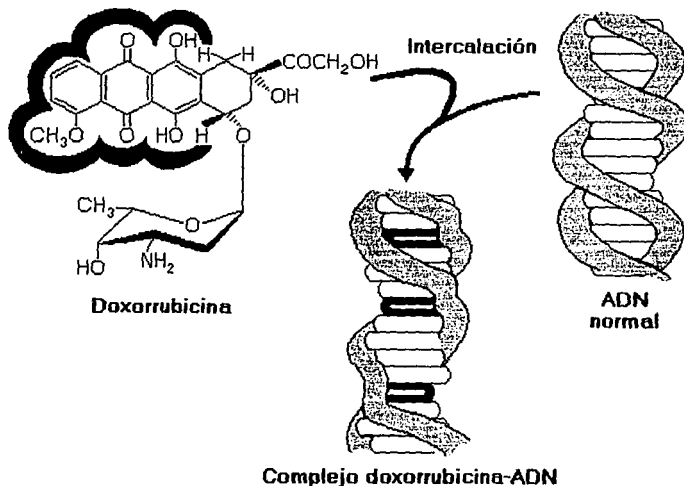


Figura 1.4.1. Intercalación de la doxorrubicina en el ADN.



Otros estudios han revelado que varias actividades de la membrana son moduladas, específicamente, por la doxorubicina; por ejemplo, la organización y estructura de los fosfolípidos, la síntesis de glucoproteínas, la fluidez de la membrana, algunas propiedades de fusión intercelular, el transporte de iones y moléculas pequeñas, y la expresión de los receptores hormonales. Aunque es evidente que las antraciclinas actúan sobre las membranas biológicas, es importante enfatizar que los efectos citotóxicos de estos antibióticos, especialmente en las células cancerosas, no se deben exclusivamente a sus interacciones con las membranas, sino que estas estructuras parecen representar el blanco de acción más sensible de la célula, durante la actividad farmacológica de las antraciclinas [5, 49].

## **1.5. Toxicidad de las antraciclinas.**

El mecanismo de acción de las antraciclinas es el mismo en células cancerosas y en células normales, por lo que su citotoxicidad sobre estas últimas es una de las dos principales razones por las cuales su uso debe ser restringido y bajo una estricta vigilancia médica. La otra razón es la resistencia espontánea o adquirida por parte de las células tumorales, frente a la acción de estos fármacos.

Estudios en cultivos celulares y en animales de laboratorio, han mostrado una rápida penetración celular y su unión a la cromatina perinuclear. De esta manera, la actividad mitótica es inhibida rápidamente, así como la síntesis de los ácidos nucleicos, dando origen a mutagénesis y aberraciones cromosómicas. Es común la detección de síndromes inmunosupresivos, y se atribuyen a estos antibióticos propiedades carcinogénicas. Los efectos tóxicos más característicos de las antraciclinas son: toxicidad cardíaca progresiva, y mielosupresión en prácticamente todas las especies animales de experimentación, y en el propio ser humano. Tanto en la cardiotoxicidad (crónica o aguda) como en la resistencia al efecto de las antraciclinas, es probable que el mecanismo de acción se manifieste, principalmente, sobre las membranas celulares [5, 11, 40, 43, 50].

La cardiopatía ocurre en aproximadamente el 2.2 % de los pacientes después de haber acumulado varias dosis superiores a 650 mg/m<sup>2</sup>, de daunorrubicina, o 550 mg/m<sup>2</sup>, de doxorubicina. La supresión de la médula ósea se presenta en el 70 % de los casos, y otras reacciones como estomatitis (80 %), náusea y vómito (20-55 %), y alopecia (en prácticamente todos los casos), así como ocasionalmente anorexia, diarrea, fiebre, urticaria, anafilaxis y necrosis local en el sitio de la inyección, también se hacen presentes [2, 5, 12, 24, 33, 41, 43].

La causa más importante por la cual la quimioterapia contra el cáncer suele fracasar, es el desarrollo de resistencia de las células malignas hacia los fármacos. En el caso de las antraciclinas, los mecanismos de resistencia parecen derivarse de diversos factores, como la penetración disminuida del antibiótico al interior de la célula, la alteración de la sensibilidad de las ADN y ARN polimerasas, y un incremento en la eficiencia del transporte activo del fármaco hacia el exterior de la célula [5, 41, 49].

## 1.6. Farmacología de las antraciclinas.

La farmacología de las antraciclinas en humanos (esencialmente de la doxorubicina y de la daunorrubicina) ha sido difícil de definir, aunque las rutas metabólicas de estos fármacos parecen ser similares. Su administración es por vía parenteral puesto que el enlace glucosídico por el que la daunosamina se une a la antraciclina es escindido en el tracto gastrointestinal y esto inactiva a las antraciclinas si se les administra por vía oral [41]. Las principales transformaciones metabólicas de la doxorubicina son: la reducción de la cadena lateral en donde se encuentra el grupo carbonilo, para obtener un alcohol secundario: el adriamicinol (13-dihidrodoxorubicina); y la escisión reductiva de la daunosamina con la formación de la 10-desoxiadriamicinona (10-desoxidoxorubicinona), véase la figura 1.6.1. De una manera similar, la daunorrubicina es reducida hasta daunorrubicinol. Ambos alcoholes son agentes citotóxicos activos. Estas reducciones son catalizadas por aldo-ceto reductasas, dependientes del fosfato reducido de nicotinamida-adenin-dinucleótido (NADPH) citoplásmico, que se encuentran presentes en todos los tejidos en donde se localizan las antraciclinas, y son estas enzimas las que, probablemente, determinan la farmacocinética global de estos fármacos. Para la reductasa, la daunorrubicina es un mejor sustrato que la doxorubicina. Al igual que estos fármacos, sus formas reducidas, como el adriamicinol y el daunorrubicinol, son a la vez sustratos para las glucosidasas microsomales que están presentes en la mayoría de los tejidos [24, 41].

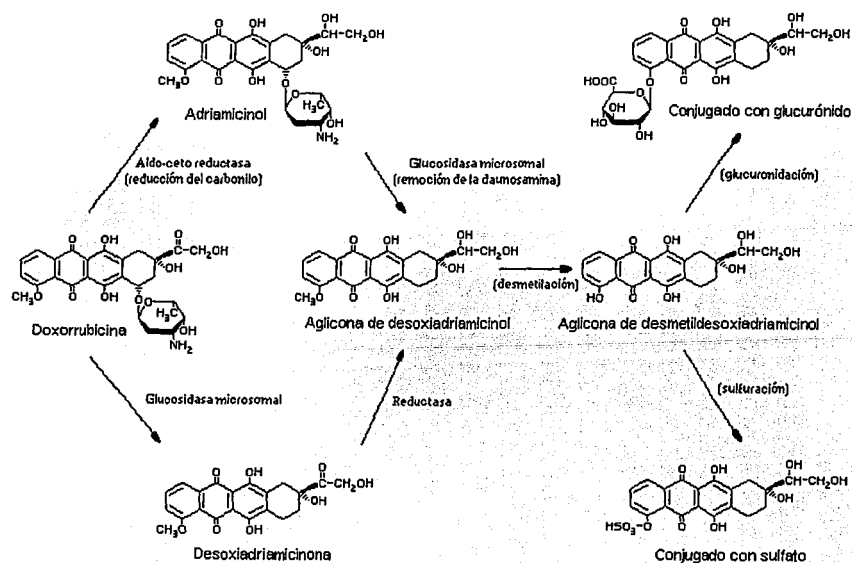


Figura 1.6.1. Reacciones metabólicas de la doxorubicina.

Dichas enzimas descomponen a las antraciclinas en agliconas inactivas más el aminoazúcar libre; las agliconas son desmetiladas por reacciones de conjugación, que dan como resultado sustituciones de ésteres de sulfato y glucurónido. Las antraciclinonas así substituidas son excretadas principalmente por la bilis. Por esta vía, al término de 7 días, aproximadamente el 40 % de la dosis de doxorubicina administrada es excretada, y de tal cantidad el 42 % es doxorubicina, el 22 % es adriamicinol y el resto son otros metabolitos.

## 1.7. Importancia clínica e industrial de las antraciclinas.

Desde 1963, cuando se determinó que la daunorrubicina era un potente agente antineoplástico, muchos programas de investigación tanto industriales como académicos se intensificaron con el objetivo de aislar y caracterizar nuevas cepas productoras de antraciclinas.

Con el descubrimiento de la doxorubicina nuevas luces se encendieron en la búsqueda de otros compuestos antraciclínicos, más eficientes y menos tóxicos que aquellos que ya se conocían.

Hasta nuestros días, la búsqueda continúa. Se han desarrollado nuevas antraciclinas que poseen un espectro de actividad antitumoral más amplio que la doxorubicina y que la daunorrubicina (algunos de los nuevos fármacos son derivados de ellas), además de representar un menor riesgo por su cardiotoxicidad reducida. Estos logros se han derivado de síntesis químicas y métodos biológicos como la bioconversión.

La eficacia real de estos compuestos aún no ha sido definida en las etapas de experimentación en las cuales se encuentran todavía, sin embargo, algunos derivados de doxorubicina, daunorrubicina y carminomicina, se utilizan con frecuencia en dosificaciones combinadas, aportando resultados alentadores en el tratamiento de algunos cánceres.

Aunque las cuatro antraciclinas principales que han sido aprobadas para su uso clínico en diversas partes del mundo han probado ser muy efectivas en contra de diferentes tipos de sarcomas, y una amplia variedad de neoplasias, neuroblastomas, linfomas y leucemias agudas, la doxorubicina es la más estudiada en cuanto a sus propiedades terapéuticas, y no es por casualidad: posee el más amplio espectro entre todas las antraciclinas, y es la más efectiva y la menos tóxica de todas aquellas que son producidas fermentativamente. En la tabla 1.7.1. se enlistan las principales patologías en que es administrado este antibiótico, ya sea como único agente medicamentoso o en combinación con otros principios activos.

La daunorrubicina y la doxorubicina son moderadamente activas contra bacterias grampositivas y ácidorresistentes, y no causan efecto alguno en las gramnegativas. Solamente una cepa de *Streptococcus fecalis* ha sido reportada como un organismo sumamente sensible a la doxorubicina [27, 50]. Algunos estudios han demostrado que ambas antraciclinas son inhibidores potentes de la transcriptasa reversa, cuya actividad es esencial para la replicación de los retrovirus; de tal forma que pueden ser buenas candidatas para ser aplicadas en la quimioterapia contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (*sida*) [38].

En términos generales, la doxorubicina produce el doble de toxicidad y de efecto terapéutico en relación con la daunorrubicina, lo que lo hace uno de los antineoplásticos de mayor demanda en la actualidad [51].

**Tabla 1.7.1. Espectro de actividad antitumoral de la doxorubicina.**

Adenocarcinoma de estómago	Leucemia granulocítica
Adenocarcinoma de mama	Leucemia linfoblástica
Adenocarcinoma de ovario	Leucemia mieloblástica
Adenocarcinoma de próstata	Leucemia promielocítica
Adenocarcinoma de vejiga	Linfoma de Burkitt
Cáncer esofágico	Linfomas de Hodgkin y no Hodgkin
Cáncer pulmonar	Linfosarcoma
Carcinoma acútico de Ehrlich	Micosis fungoides
Carcinoma broncogénico	Mieloma múltiple
Carcinoma celular escamoso de la cabeza y del cuello	Neuroblastoma
Carcinoma celular escamoso del cérvix	Reticulosarcoma
Carcinoma pancreático y biliar	Sarcoma de Ewing
Carcinoma testicular	Sarcomas óseo y de tejidos blandos
Carcinoma tiroideo	Tumor carcinoide maligno metastático del intestino
Hepatoma	Tumor de Wilms

Recopilado de [2, 3, 12; 25, 40, 41, 43, 50]

La única antraciclina que se comercia en México es la doxorubicina, con las marcas registradas *Adriblastina*\* y *Doxotec*\*\* (ambos medicamentos con clorhidrato de doxorubicina, 10 mg; liofilizado con frasco ampula) por Farmitalia Carlo Erba, S.A. de C.V. y Tecnofarma, S.A. de C.V., respectivamente [42, 43, 50].

## 1.8. Biosíntesis de las antraciclinas.

La ruta biosintética a partir de un decacétido hipotético derivado de la condensación de nueve equivalentes de malonil-CoA y una molécula iniciadora de propionil-CoA, análogamente a como ocurre durante la síntesis de ácidos grasos, ha sido la explicación más aceptada sobre la síntesis *in vivo* de las antraciclinas [2, 15, 16, 22, 25, 28, 32, 34, 35, 36, 50]. El policétido se forma por la condensación lineal de la unidad de propionato iniciadora más las unidades de acetato secuenciales, con la subsecuente pérdida del grupo carboxilo terminal. La unidad iniciadora puede variar, dependiendo de la cadena carbonada lateral unida al carbono 9. Así, dicha unidad puede ser un acetato, un propionato, un butirato (o acetoacetato), o un iso-butilato [25, 50]. Se cree que un sistema de policétido sintetasas (similares a la  $\beta$ -cetoacil sintetasa presente en la formación de los ácidos grasos) es el responsable de catalizar la formación del oligocétido que da origen al cromóforo de antraquinona, aunque también se ha planteado la

\* El medicamento *Adriblastina* es vendido en dos presentaciones: de 10 y de 50 mg, cuyos precios son N/\$80.00 y N/\$350.00, respectivamente (precios de menudeo, septiembre de 1994).

\*\* El medicamento *Doxotec* ha sido introducido al mercado recientemente.

posibilidad de que la formación de la estructura tetracíclica ocurra espontáneamente como un evento de estabilización [32, 50]. Las principales reacciones que sufre la aglicona de antraciclina a lo largo de la biosíntesis de la mayoría de estos compuestos constan de hidroxilación, metilación, glucosilación, oxidación, reducción, y acilación [28, 32]. Hay evidencias, por experimentos realizados con inhibidores de la metilación y mutantes bloqueadas, de que el grupo metoxilo de la daunorrubicina y de la doxorubicina se deriva del aminoácido metionina; mientras que el aminoazúcar daunosamina parece derivarse directamente de la glucosa [34, 36, 50]. Se ha observado que las diversas mutantes de *Streptomyces peucetius* son muy inestables y tienden a no ser confiables en su viabilidad, por lo que los estudios sobre biosíntesis que se han realizado con mutantes bloqueadas de dicho microorganismo no han sido sistemáticos; de ahí que casi todas las rutas elucidadas para las síntesis de estos antibióticos son inferencias teóricas más o menos aceptadas por la mayoría de los investigadores quienes piensan que la ruta biosintética para las antraciclinas puede ser similar en todos los microorganismos productores [25, 32]. Una vez que se ha formado la cadena policétida, sufre una deshidratación sin perder un grupo ceto ubicado en el carbono 2 del esqueleto de la futura antraciclina. En esta etapa no se descarta la posibilidad de formación de intermediarios mono y bicíclicos [22]. La reducción del grupo ceto del carbono 2 seguida por una deshidratación, da origen a un hipotético intermediario cuya enolización resulta en la formación del ácido aklanónico. Este último compuesto parece ser el primer intermediario estable después de la formación de los anillos aromáticos de la aglicona; una metiltransferasa lo convierte en su metil éster completándose después, vía cicloadición por una ciclasa, la configuración del anillo alicíclico. El compuesto así formado es la aklaviketona, la cual presenta en su estructura el característico esqueleto de la tetrahidro-naftacenoquinona [15, 22, 28, 32]. Por la posible acción de una reductasa, la aklaviketona es hidroxilada en el carbono 7 de la molécula tetracíclica, obteniéndose así la aklavinona; que es la primer antraciclina completa de la ruta biosintética. Es también el mayor precursor común de los principales grupos antracilínicos: daunorrubicina (v. gr. doxorubicina y sus derivados, y las baumicinas); aclacinomicina (v. gr. aclacinomicinas A, B, y Y, y la aklavina); rhodomicina (v. gr. todas las  $\beta$ -rhodomicinas); carminomicina (v. gr. carminomicinas y sus derivados); pirromicina (v. gr. cinerubinas); nogalamicina y steffimicina [2, 15, 16, 22, 25, 28, 32, 34, 50]. La aklavinona puede ser oxidada en el carbono 1 para formar  $\epsilon$ -pirromicinona; o en el carbono 11 para formar  $\epsilon$ -rhodomicinona; o en ambos carbonos a la vez con lo cual se producen iso-rhodomicinonas. En estos últimos eventos, pueden estar involucradas una o más hidroxilasas [15, 22, 28, 34]. Por otra parte, la aklavinona puede ser glucosilada directamente para producir aklavina y aclacinomicina A. Sin embargo, en la ruta biosintética de la daunorrubicina, la aklavinona es hidroxilada para formar la  $\epsilon$ -rhodomicinona siendo este último el compuesto predominante (junto con las baumicinas A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>) durante las fermentaciones para la producción de la daunorrubicina y sus derivados [15, 30, 36, 50]. La coloración rojiza de la  $\epsilon$ -rhodomicinona, y de otros compuestos antracilínicos, se debe a la presencia del grupo hidroxilo en el carbono 11 de la molécula tetracíclica, a diferencia de los primeros intermediarios que son pigmentos amarillos [29, 32]. Se ha observado que la conversión de aklavinona hacia  $\epsilon$ -rhodomicinona, catalizada por una hidroxilasa, es dependiente del oxígeno y de la presencia del NADPH [15, 32]. En la figura 1.8.1. se representa la ruta biosintética vía oligocétido, hasta la formación de la  $\epsilon$ -rhodomicinona y otros intermediarios [2, 15, 22, 25, 28, 29, 32, 34, 36, 50]. Hace todavía algunos años no se definía el rol de la  $\epsilon$ -rhodomicinona durante la biosíntesis de antraciclinas. Se creía que podía ser un producto colateral de la síntesis de la daunorrubicina, pero con algunos trabajos realizados con mutantes bloqueadas y bioconversiones se determinó finalmente que es, sin duda, el principal intermediario en la biosíntesis de la daunorrubicina [14, 29, 30, 32, 35, 36, 50].

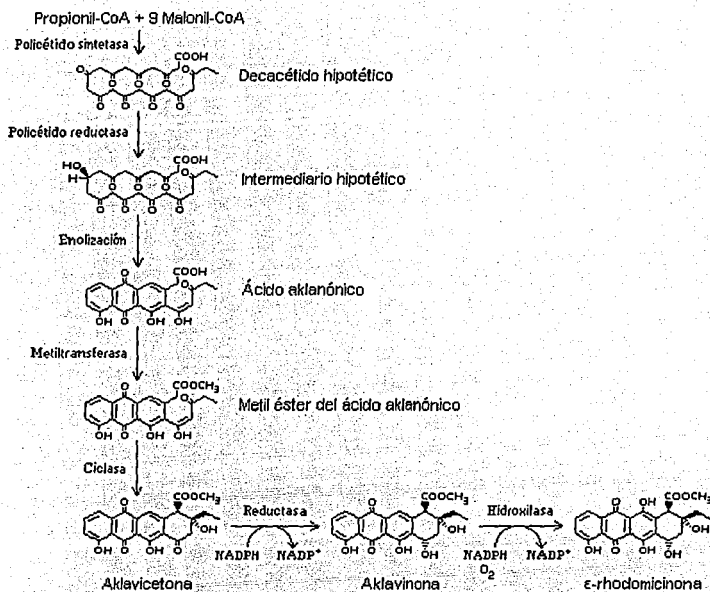


Figura 1.8.1. Ruta biosintética de las antraciclinas hasta la formación de la  $\epsilon$ -rhodomiconona.

Una vez que se ha formado la  $\epsilon$ -rhodomiconona, sufre una glucosilación que inicia una serie de transformaciones que dan por resultado la formación de otras antraciclinas. La secuencia de reacciones enzimáticas que se llevan a cabo desde la  $\epsilon$ -rhodomiconona hasta la daunorrubicina, es menos conocida que aquella que se da desde la condensación del decacético hipotético hasta la síntesis de la  $\epsilon$ -rhodomiconona, pero resulta obvio que las siguientes reacciones son las que tienen lugar: glucosilación (con daunosamina para el caso de la daunorrubicina) del grupo hidroxilo del carbono 7; sustitución del grupo carbometoxilo ubicado en el carbono 10; oxidación de un grupo metileno a un grupo ceto en la posición del carbono 13; y la metilación del grupo hidroxilo del carbono 4. En relación con esta última reacción, es posible que para llevarse a cabo tiene que ocurrir después de la descarbometoxilación en el carbono 10, ya que tal vez las agliconas que contienen al grupo carbometoxilo no son sustratos para las 4-O-metiltransferasas que llevan a cabo la metilación del grupo hidroxilo del carbono 4. De aquí se infiere el hecho de que la daunorrubicina no es un intermediario sino un producto del metabolismo de la daunorrubicina. Finalmente, la doxorubicina se forma a partir de una oxidación adicional del carbono 14 reduciendo un grupo hidroxilo en esa posición [14, 28, 32, 36, 50].

Con esto último puede determinarse que la daunorrubicina es el precursor directo durante la biosíntesis de la doxorubicina por *Streptomyces peucetius* variante *caesius* [17, 29, 32].

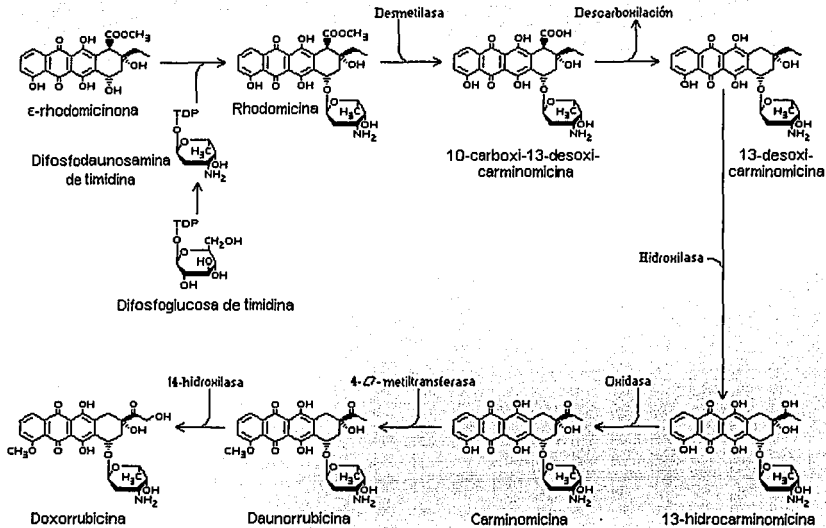


Figura 1.8.2. Ruta biosintética desde la ε-rhodomicinona hasta la doxorubicina.

Se han dado a conocer rutas que son colaterales con la anteriormente descrita y que dan origen al resto de las antraciclinas que no pertenecen al grupo principal de la daunorrubicina pero, tal y como ocurre con esta última, las reacciones enzimáticas que llevan a su formación no han sido elucidadas completamente [2, 15, 22, 25, 28, 29, 32, 34]. En la figura 1.8.2. se resume una de las rutas biosintéticas (la mejor aceptada) para la formación de la daunorrubicina y, consecuentemente, de la doxorubicina, a partir de la ε-rhodomicinona [2, 22, 25, 28, 29, 32, 34, 36, 50].

La daunorrubicina es sintetizada por varias rutas, y la mayor parte de ella no se obtiene libremente sino en forma de glucósidos con mayor peso molecular llamados baumicinas A1 y A2, cuya hidrólisis ácida genera la daunorrubicina como tal [25, 29, 36, 39, 50].

## **PARTE II**

---

*“La idea es una semilla;  
el método es la tierra que proporciona las condiciones  
en las que aquella pueda desarrollarse,  
florecer y dar los mejores frutos posibles  
conforme a su naturaleza.*

*Pero del mismo modo  
que nada crecerá en el suelo  
que no haya sido previamente sembrado en él,  
así tampoco desarrollará  
el método experimental cosa alguna,  
excepto las ideas que le hayan sido sometidas.  
El método por sí solo no engendra nada.”*

**Claude Bernard**

---



## 2. MATERIAL, EQUIPO Y MÉTODOS

### NOTA IMPORTANTE:

Todo aquello que se encuentre en contacto con los pigmentos antracínicos, ya sea material, equipo, lugar de trabajo, etc., debe ser cuidadosamente aseado (tal y como se indica más adelante); además de que el laboratorista debe tomar todas las precauciones que sean pertinentes para su propia seguridad y para la de los demás, como el uso de guantes de látex, anteojos de seguridad, bata, mascarilla, etc., así como la restricción de su área de trabajo y de almacenaje, refrigeración y congelación. Todo esto debido a la **elevada toxicidad y considerable potencial cancerígeno de las antracilinas.**

### 2.1. Condiciones de cultivo.

#### 2.1.1. Cepa.

La cepa utilizada en este trabajo fue *Streptomyces peucetius* variante *caesi* ATCC 27952. Fue mantenida viable como micelio fragmentado (lavado con solución salina al 0.85 %) en una suspensión en glicerol (Baker<sup>MR</sup>) al 20 %, y en una concentración micelial de 40 % (v/v) a -20°C. Dicha suspensión (*stock*) fue resembrada cada dos meses.

### 2.1.2. Agua.

Se emplearon tres tipos de agua; tanto para la limpieza del material, preparación de reactivos y *stocks* como para la preparación de los medios de cultivo: agua destilada normal, agua destilada libre de fosfatos, y agua corriente\*. El uso de cada tipo de agua se indica a lo largo de las siguientes secciones.

### 2.1.3. Esterilización.

La esterilización tanto del material de laboratorio como de los medios de cultivo se llevó a cabo a una temperatura de 122°C durante 20 minutos; en cambio, el material que contenía desechos biológicos y antraciclínicos fue debidamente neutralizado (ver más adelante) y esterilizado a 122°C durante 30 minutos.

### 2.1.4. Esporulación.

Antes de iniciar cada experimento la cepa fue sometida a condiciones de esporulación durante 10 días a 29°C en el siguiente medio de cultivo\*\* en g/l; glucosa (Baker<sup>MR</sup>), 10; almidón (Difco<sup>MR</sup>), 20; extracto de levadura (Difco<sup>MR</sup>), 5; caseína hidrolizada (Merck<sup>MR</sup>), 5; CaCO<sub>3</sub> (Merck<sup>MR</sup>), 1; bacto agar (Difco<sup>MR</sup>), 15; sacarosa (Baker<sup>MR</sup>), 20; y agua destilada. Los carbohidratos se esterilizaron independientemente del resto de los nutrientes para evitar que se presentaran reacciones de descomposición ("caramelización") en el medio. El medio de esporulación fue contenido en cajas de Petri de plástico (Technicare<sup>MR</sup>) en donde se sembró un volumen de 0.05 ml de la suspensión de micelio fragmentado de *Streptomyces penicellius* variante *caesius*, expandiéndolo sobre toda la superficie del medio con un asa de vidrio. Al cabo de 10 días se observó la presencia de micelio vegetativo pigmentado en rojo intenso, y de abundante micelio aéreo con una tenue coloración grisácea o azul-verdosa. El cultivo tuvo una apariencia terrosa y se encontró fuertemente arraigado al agar nutriente. Permaneciendo en las placas de esporulación su viabilidad permaneció constante durante un mes.

### 2.1.5. Matraces.

Los cultivos líquidos que se realizaron durante esta investigación, se llevaron a cabo en matraces de 250 ml con deflectores, modelos *F-06-11* de Sigma-Aldrich<sup>MR</sup> y *2541-S0014* de Bellco Glass<sup>MR</sup>. Para lograr una dispersión homogénea del micelio, los matraces incluían, además del medio, perlas de vidrio para ebullición de 5 mm de diámetro (B. Braun<sup>MR</sup>).

\* Agua suministrada como servicio general a la Ciudad Universitaria (México, D.F.) de la Universidad Nacional Autónoma de México, y cuyo análisis fisicoquímico revela que contiene vestigios de Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Mg(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y NaCl; teniendo una dureza total de 130 ppm de CaCO<sub>3</sub> y una dureza permanente igual a 54 ppm de CaCO<sub>3</sub>, así como un pH entre 6.88 y 7.00 [44].

\*\* Medio de cultivo para esporulación desarrollado y adaptado por el grupo de investigación del Laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Con la dispersión del micelio, la superficie celular de contacto se incrementa, facilitando así el consumo de los nutrientes, y la transferencia de oxígeno que es fundamental en la biosíntesis de los compuestos antraciclínicos. Para el crecimiento del preinóculo se utilizaron 10 perlas en cada matraz, y para el caso de la fermentación (ver más adelante) se utilizaron dos perlas por medio. Cada matraz contenía 50 ml de medio de cultivo y se utilizaron tapones de gasa y algodón de consistencia homogénea.

#### 2.1.6. Incubación.

Para llevar a cabo la incubación del microorganismo en los diferentes medios de cultivo, se contó con el agitador-incubador de medio ambiente controlado Psycrothenn<sup>MR</sup> y el incubador orbital con sistema de enfriamiento Gallenkamp<sup>MR</sup>. En algunas ocasiones, se utilizó también el cuarto de temperatura constante a 29°C, del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### 2.1.7. Preinóculo.

En este estudio se determinó que el preinóculo estaría constituido por el micelio de *Streptomyces peucetius* variante *caesi* crecido en un caldo de levadura-malta-glucosa (LMG), similar al que proponen Michael L. Dekleva y sus colaboradores para el crecimiento de *Streptomyces peucetius* [18, 19]. El micelio crecido en las placas de esporulación fue el que se inoculó en el medio LMG para la obtención del preinóculo. La formulación de este medio fue la siguiente: en g/l; extracto de levadura (Difco<sup>MR</sup>), 4; extracto de malta (Difco<sup>MR</sup>), 10; glucosa (Baker<sup>MR</sup>), 4; y agua destilada. El pH del medio (ver más adelante) fue ajustado a 7.30 antes de la esterilización, y las condiciones físicas para el crecimiento del microorganismo fueron: 180 rpm y 29°C durante 48 horas [18].

#### 2.1.8. Inóculo.

Al concluir el tiempo de crecimiento del preinóculo, este último fue separado del medio por centrifugación en una centrífuga clínica Equipar<sup>MR</sup> a 5000 rpm durante 5 minutos. Después de desechar el sobrenadante, la biomasa fue lavada dos veces con una solución salina isotónica estéril. Posteriormente, con el micelio lavado se preparó una suspensión en agua destilada estéril. Dicha suspensión fue diluida hasta obtener con ella una absorbancia aproximada a 0.5 con una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro digital de espectros visible y ultravioleta modelo *Spectronic 21* de Bausch & Lomb<sup>MR</sup>. De esta suspensión se añadieron 1.25 ml (2.5 % en relación con el volumen del medio de cultivo\*) a cada matraz que contenía el medio de producción.

\* Preparación de inóculo desarrollada y adaptada por el grupo de investigación del Laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### 2.1.9. Fermentación.

El medio de cultivo utilizado como medio de producción está basado en el que proponen Federico Arcamone y sus colaboradores para la producción de doxorubicina por *Streptomyces peucetius* variante *caesius* [2, 3]. Para este medio de cultivo se utilizaron ingredientes con grado de pureza analítica, alimentaria e industrial. Los reactivos con grado analítico fueron de Baker<sup>SM</sup> (en el caso de los sulfatos, fosfato, NaCl y glucosa) y de Merck<sup>MR</sup> (CaCO<sub>3</sub>); el nutriente con grado alimentario fue la levadura de cerveza desamargada distribuida como complemento alimenticio por Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.; y los proveedores de los nutrientes con grado industrial para la formulación del medio de fermentación fueron Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.; y Pharm Yeast de México, S.A.\*

El volumen de trabajo del medio fue aforado con agua corriente. La formulación del medio de fermentación fue la siguiente: en g/l; glucosa, 60; levadura de cerveza, 25; NaCl, 2; CaCO<sub>3</sub>, 2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; MgSO<sub>4</sub>, 0.1; FeSO<sub>4</sub>, 0.005; ZnSO<sub>4</sub>, 0.006; y agua corriente [3]. La glucosa fue esterilizada por separado y el pH del medio (ver más adelante) fue ajustado a 7.00 antes de la esterilización. La fermentación se llevó a cabo a 180 rpm y 29°C.

### 2.1.10. Muestreo.

Para establecer las cinéticas de producción, crecimiento, consumo de nutrientes y pH, se tomaron muestras del medio de producción cada 24 horas: 1 ml de medio para la extracción de las antraciclinas, y 2 ml para el crecimiento, el consumo de nutrientes y el pH. Todas las condiciones evaluadas durante los experimentos de fermentación fueron realizados por triplicado.

## 2.2. Métodos analíticos generales.

### 2.2.1. Crecimiento.

El crecimiento de *Streptomyces peucetius* variante *caesius* fue analizado mediante la cuantificación del volumen micelial en relación con el volumen total del medio de cultivo, por lo que fue registrado como fracción micelial. Este procedimiento es ampliamente usado y consiste en centrifugar una muestra del medio de cultivo midiendo el volumen del micelio sedimentado. Dicho volumen es dividido entre el volumen total de la muestra y el cociente así obtenido es registrado como fracción micelial en una gráfica contra el tiempo de cultivo.

\* Según el análisis de Pharm Yeast de México, S. A., la levadura de cerveza utilizada para esta investigación está autolizada, desamargada y es de grado U.S.P. Su contenido proteínico no es menor del 45 %, y cada gramo de levadura contiene 0.30 mg de ácido nicotínico, 0.04 mg de riboflavina, y 0.12 mg de tiamina.

### 2.2.2. Glucosa.

El consumo de la fuente de carbono fue analizado con base en la cuantificación de la glucosa remanente en el medio de fermentación mediante el método enzimático colorimétrico *Glucosa God-Pad* de Erlic<sup>MR</sup>, utilizado generalmente para fines de diagnóstico clínico. Para llevar a cabo este método, se preparó una solución con un amortiguador (*buffer*), que contiene la enzima glucosa oxidasa, la 4-amino antipirina, y fenol.

La mezcla se conservó protegida de la luz y a 4°C. Bajo estas condiciones, fue estable durante un mes. Antes de usarla, se dejó ambientar a 15 o 25°C. La muestra requerida para el análisis fue de 20 µl y se hizo reaccionar con 2 ml de la mezcla de reacción. El periodo de incubación fue de 25 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz, produciéndose una coloración rojiza debida a la presencia de una antipirilquinonimina. Se determinó la absorbancia a 510 nm (en este caso se hizo con un espectrofotómetro digital de espectros visible y ultravioleta modelo *Spectronic 21* de Bausch & Lomb<sup>MR</sup>) dentro de los 10 minutos posteriores al periodo de incubación. La coloración fue proporcional a la concentración de la glucosa remanente en el medio. Dicha concentración fue determinada en relación matemática con la absorbancia del suero patrón cuya concentración de glucosa fue de 100 mg/dl (o 1 g/l), suministrado en el mismo paquete de reactivos de Erlic<sup>MR</sup>.

### 2.2.3. Amonio.

Para evaluar el consumo de la fuente de nitrógeno, se optó por el método de la reacción fenol-hipoclorito para la determinación de la concentración del ion amonio remanente en el medio de fermentación, propuesto por M. W. Weatherburn [52]. Si bien la única fuente de nitrógeno en el medio de producción la constituye la levadura de cerveza (nutriente rico en compuestos nitrogenados), la cuantificación de la concentración del ion amonio tiene sentido si se considera que uno de los mecanismos fundamentales que tienen los microorganismos para incorporar el nitrógeno a sus células es mediante la asimilación reductiva del ion amonio proveniente del medio extracelular. Los aminoácidos contenidos en la levadura de cerveza, sin la presencia de azúcares reductores, sufren reacciones entre ellos en condiciones de tratamientos térmicos excesivos (como aquellas presentes en una autoclave), formando enlaces isopeptídicos y liberando NH<sub>3</sub> [10]. De aquí se desprende la presencia del ion amonio en el medio. El método se basa en la reacción colorida de Berthelot [52], y su desarrollo se llevó a cabo de la siguiente manera:

Sistema de reacción:

Solución A: Fenol (Baker<sup>MR</sup>) al 1 % + Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO]·2H<sub>2</sub>O (Merck<sup>MR</sup>) al 0.005 %.

Esta solución es estable durante un mes a 4°C y protegida de la luz.

Solución B: NaOH (Merck<sup>MR</sup>) al 0.5 % + NaClO (Baker<sup>MR</sup>) al 0.05 %.

#### Procedimiento:

A 50  $\mu\text{l}$  de muestra se agregaron 2.5 ml de la solución A. Después de agitar se añadieron 2.5 ml de la solución B, agitando nuevamente. La mezcla se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente para, posteriormente, medir la absorbancia de la solución azul a 625 nm en un espectrofotómetro digital de espectros visible y ultravioleta modelo *Spectronic 21* de Bausch & Lomb<sup>MR</sup>. Para conocer la concentración (mM) del ion amonio en la muestra, su absorbancia fue interpolada en una curva estándar de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Baker<sup>MR</sup>).

#### 2.2.4. Fósforo.

El método empleado para evaluar la cinética del consumo de fósforo fue un método colorimétrico basado en la reducción del  $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (por el  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) originado por la reacción entre los fosfatos presentes en el medio y el  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  más el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  que componen la mezcla reactiva. Este método, propuesto por James B. Sumner, permitió cuantificar, únicamente, la concentración del fósforo inorgánico (Pi) que se encontraba en el medio de cultivo [45]. La forma en que se procedió para realizar este análisis es la siguiente:

#### Sistema de reacción:

Solución A:  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck<sup>MR</sup>) al 6 %.

Solución B:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Baker<sup>MR</sup>) 7.5 N.

Solución C:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Baker<sup>MR</sup>) al 9.8 % en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Baker<sup>MR</sup>) 0.15 N.

Durante el desarrollo del método se utilizó agua destilada libre de fosfatos.

#### Procedimiento:

Una alícuota de 0.2 ml del medio de cultivo fue diluida (1:18) con agua destilada libre de fosfatos. A esta solución se añadió un volumen de 0.5 ml de la solución A, agitando suavemente. Después se agregó un volumen igual de la solución B, mezclando con suavidad. Finalmente, se adicionaron 0.4 ml de la solución C, la cual se preparó justo antes de usarla para evitar, lo más posible, la oxidación del  $\text{Fe}^{++}$  a  $\text{Fe}^{+++}$ . Se dejó reaccionar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente adquiriendo una coloración azul y, posteriormente, se midió su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro digital de espectros visible y ultravioleta modelo *Spectronic 21* de Bausch & Lomb<sup>MR</sup>. La concentración de Pi ( $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ , convertidos a  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en la muestra fue obtenida por la interpolación de su absorbancia en una curva estándar de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Baker<sup>MR</sup>), aunque también puede emplearse el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Este método ofrece la ventaja de que la reacción puede

desarrollarse a temperatura ambiente y, además, el  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  es el mejor agente reductor que se ha aplicado para este análisis cuyo fundamento fue desarrollado originalmente por R. D. Bell y E. A. Doisy en 1920 [45].

### 2.2.5. pH.

El pH del medio, tanto para su ajuste como para la medición de su variación a lo largo de la fermentación, fue cuantificado con un potenciómetro digital modelo 3500 de Beckman<sup>MR</sup>. Para el ajuste del pH de los medios de cultivo se utilizaron soluciones de NaOH y HCl con concentraciones de 0.1, 1, y 10 N, dependiendo del grado de amortiguamiento inherente a la formulación de los diferentes medios.

### 2.2.6. Neutralización de desechos.

Para ser desechadas, las antraciclinas deben ser neutralizadas con una solución de NaOH (sosa industrial) en una concentración mínima de 0.05 N. La neutralización puede observarse a simple vista ya que las antraciclinas muestran propiedades de indicadores ácido-base, virando la coloración (ya sea de los extractos antraciclínicos o de la biomasa de la cual se extraen) de anaranjado o rojo (pH=3.00 o menos) hasta púrpura o violeta (pH=9.00 o más) [24]. Después de haber sido neutralizadas las antraciclinas, se procede a limpiar el área de trabajo, material y equipo, bajo las normas de seguridad estipuladas por cada laboratorio.

## 2.3. Métodos de extracción y cuantificación de antraciclinas.

### 2.3.1. Extracción de antraciclinas intracelulares.

El método de extracción de antraciclinas a partir de la biomasa que fue utilizado en esta investigación, es el mismo que proponen Federico Arcamone y sus colaboradores para el conjunto de antraciclinas, especialmente la doxorubicina y la daunorrubicina, producidas por *Streptomyces peucetius* variante *caesioides* [2, 3, 50]. Este método consistió en una extracción, con un sistema disolvente formado por 4 volúmenes de  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  (Merck<sup>MR</sup>) y 1 volumen de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Baker<sup>MR</sup>) 0.1 N, de las células separadas previamente del medio nutritivo. Los pigmentos antraciclínicos fueron extraídos repetidamente hasta que la masa micelial o el extracto eran incoloros. Posteriormente, se midió la absorbancia del extracto a 495 nm con una absorbancia de 220 (1 %, 1 cm) en un espectrofotómetro digital de espectros visible y ultravioleta modelo *Spectronic 21* de Bausch & Lomb<sup>MR</sup>. Aplicando la ley fotométrica de Bouguer y Beer fue posible determinar la concentración de antraciclinas intracelulares en el medio de producción. Inmediatamente después, el extracto fue neutralizado con una solución amortiguadora (*buffer*) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Baker<sup>MR</sup>)/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Baker<sup>MR</sup>) 0.25 M con pH=7.00. El disolvente del extracto fue evaporado tanto por liofilización como por vacío, y los cristales fueron posteriormente resuspendidos en  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Merck<sup>MR</sup>) para su análisis cromatográfico en capa fina (ver más adelante).

### 2.3.2. Extracción de antraciclinas extracelulares.

Las antraciclinas extracelulares fueron extraídas a partir del sobrenadante que resultó cuando la biomasa fue separada del medio de fermentación. El método que se utilizó es también propuesto por Federico Arcamone y sus colaboradores [2, 3, 50]. Consistió en varias extracciones sucesivas con una mezcla de 9 volúmenes de  $\text{CHCl}_3$  (Merck<sup>MR</sup>) y 1 volumen de  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Merck<sup>MR</sup>), manteniendo el pH constante en 8.60 con una solución amortiguadora (*buffer*) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Baker<sup>MR</sup>)/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Baker<sup>MR</sup>) 0.1 M. Tal como se hizo anteriormente, se midió la absorbancia del extracto de la misma forma y bajo los mismos criterios con los cuales pudo determinarse la concentración de antraciclinas intracelulares en el medio de fermentación. Estos extractos fueron evaporados a temperatura ambiente gracias a la elevada presión de vapor propia de los disolventes, y los cristales fueron resuspendidos en la misma mezcla con la que se extrajeron para su análisis cromatográfico en capa fina.

### 2.3.3. Cromatografía en capa fina.

Son varias las técnicas cromatográficas que han sido reportadas para la purificación, principalmente, de doxorubicina y daunorrubicina [2, 3, 17, 24, 36, 53, 54]. Se han empleado técnicas de cromatografía en columna, como es el caso de la cromatografía líquida de alta presión, así como cromatografía en papel o en capa fina. Como un complemento para este trabajo de investigación, los extractos antraciclínicos fueron sometidos a cromatografía en capa fina utilizando varias mezclas de disolventes como fases móviles. Los sistemas de elución que se probaron fueron aquellos que se han utilizado para aislar la doxorubicina, ya que *Streptomyces peucetius* variante *caesius* es el único organismo que produce este antibiótico, por lo que la cuantificación del mismo adquirió una singular importancia debido a que los reportes acerca de su producción y purificación no son del todo claros. Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo sobre cromatofolios AL de silicagel 60 (0.2 mm de espesor; sin indicador fluorescente) para cromatografía en capa fina (Merck<sup>MR</sup>). La elución se desarrolló en cámaras cromatográficas con doble pozo (CAMAG<sup>MR</sup>), y la cuantificación del compuesto ya separado se hizo con un digitalizador (*scamer*) para cromatografía en capa fina modelo *TLC Scanner II*, junto con el paquete para computadora (*software*) "Cats" versión 3.1 para cromatografía en capa fina de CAMAG<sup>MR</sup>. A continuación, se exponen los sistemas de elución que fueron probados, con sus respectivas proporciones en v/v:

Sistema A:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  (100:20:2)

Sistema B:  $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OH}$  :  $\text{CH}_3\text{COOH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  (4:1:5)

Sistema C:  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$

Sistema D:  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  :  $\text{CH}_3\text{COOH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  (80:20:14:6)

Sistema E:  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  :  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (80:20:4)

Sistema F:  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  :  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (93:5:2)

Sistema G:  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  :  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (76:20:4)



## 2.4. Métodos estadísticos.

### 2.4.1. Parámetros estadísticos básicos\*.

En los diferentes experimentos se determinaron los valores de la media

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

la variancia

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

la desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

y el coeficiente de variación

$$CV = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) 100$$

en donde:

$n$  es el número total de las muestras.

$x_i$  es el valor de la variable de la  $i$ -ésima observación.

$\bar{x}$  es la media de la variable.

\* Actualmente existe un número incalculable de textos elementales sobre estadística (la mayoría de ellos fácilmente comprensibles) accesibles en el mercado y bibliotecas, en los que el lector puede documentarse con mayor profundidad acerca de los parámetros estadísticos básicos que aquí se exponen.

### 2.4.2. Análisis de la variancia.

Además se aplicó el análisis de la variancia de clasificación simple, el cual es un método de comparación estadística entre dos o más tratamientos en donde los mismos son asignados aleatoriamente en cada experimento para confirmar o refutar la hipótesis de la *no diferencia* entre sus medias. En el análisis formal de los resultados, se determina la ecuación matemática de un modelo estadístico lineal:

$$y_{li} = \mu + \tau_l + \varepsilon_{li} \begin{cases} l = 1, 2, \dots, k \\ i = 1, 2, \dots, n \end{cases}$$

en donde  $y_{li}$  es la  $li$ -ésima observación,  $\mu$  es un parámetro común para todos los tratamientos llamado media poblacional,  $\tau_l$  es un parámetro único para el  $l$ -ésimo tratamiento llamado el efecto del tratamiento  $l$ -ésimo, y  $\varepsilon_{li}$  es un componente del error aleatorio. En este modelo, se encuentra implícita una suposición que puede no ser cierta en los datos obtenidos experimentalmente. Tal suposición es que los efectos de la media poblacional, de los tratamientos, y del error son aditivos. Además, se asume que el error es una variable aleatoria distribuida normal e independientemente con una media igual a cero y una variancia constante en todos los niveles de cada factor. Es así que en teoría estadística, los mejores estimadores de las incógnitas  $\mu$  y  $\tau_l$  se obtienen por el método de los mínimos cuadrados. Dichos estimadores reducen al mínimo la suma de los cuadrados residuales (también llamada suma de cuadrados del error dentro de los tratamientos) tomados de todas las observaciones. Una forma sencilla para encontrar estos valores es mediante el análisis de la variancia [9, 13, 37].

A continuación se resume el procedimiento general del análisis de la variancia de clasificación simple.

Los datos de un experimento con una sola clasificación pueden presentarse como se muestra en la siguiente tabla:

	Clasificación de tratamiento				
	1	2	3	...	k
Observaciones dentro de un tratamiento	$y_{11}$	$y_{21}$	$y_{31}$	...	$y_{k1}$
	$y_{12}$	$y_{22}$	$y_{32}$	...	$y_{k2}$
	$y_{13}$	$y_{23}$	$y_{33}$	...	$y_{k3}$
	...	...	...	...	...
	$y_{1n}$	$y_{2n}$	$y_{3n}$	...	$y_{kn}$
Total de tratamientos	$T_1$	$T_2$	$T_3$	...	$T_k$
Número de observaciones dentro de los tratamientos	$n_1$	$n_2$	$n_3$	...	$n_k$

De esta tabla puede calcularse el total general de tratamientos y de observaciones:

$$G = \sum_{t=1}^k T_t = \text{Total general}$$

$$N = \sum_{t=1}^k n_t = \text{Número total de observaciones}$$

La tabla del análisis de la variancia para los datos anteriormente tabulados se obtiene calculando:

la suma de los cuadrados de todas las observaciones:

$$\sum y^2 = \sum_{t=1}^k \sum_{i=1}^{n_t} y_{ti}^2$$

el total general al cuadrado dividido por el número total de observaciones ( $S_A$  o factor de corrección):

$$S_A = \frac{G^2}{N}$$

la cantidad  $S_D$  que es la suma total de cuadrados corregida para la media:

$$S_D = \sum y^2 - S_A$$

el total de cada tratamiento se eleva al cuadrado y se divide por el número de observaciones que componen ese total. Estas cantidades se suman y se les sustrae el factor de corrección para dar la suma de cuadrados entre tratamientos ( $S_T$ ):

$$S_T = \sum_{t=1}^k \frac{T_t^2}{n_t} - S_A$$

la suma de cuadrados dentro de los tratamientos ( $S_R$ ):

$$S_R = \sum y^2 - S_A - S_T$$

los cuadrados medios entre tratamientos y dentro de los tratamientos se obtienen dividiendo la suma de cuadrados por sus correspondientes grados de libertad:

$$S_T^2 = \frac{S_T}{k-1}$$

$$S_R^2 = \frac{S_R}{N-k}$$

Así, la tabla del análisis de la variancia\* es:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Estimación de F
Entre Tratamientos	$S_T = \sum T_i^2 / n_i - S_A$	k-1	$S_T^2$	$S_T^2 / S_R^2$
Dentro de los tratamientos	$S_R = \sum y^2 - S_A - S_T$	N-k	$S_R^2$	
Suma corregida total de cuadrados	$S_D = \sum y^2 - S_A$	N-1		

La hipótesis de *no diferencia* sería refutada si:

$$F_{estimada} > F_{\alpha, k-1/N-k}$$

en donde  $F_{\alpha, k-1/N-k}$  es el punto de porcentaje de la distribución  $F$ , con un nivel de confianza  $\alpha$  y la relación entre k-1 grados de libertad y N-k grados de libertad. La refutación de la hipótesis se expresa como diferencia significativa, expresada con un asterisco (\*), si  $\alpha=5\%$ , o como diferencia altamente significativa, expresada con dos asteriscos (\*\*), si  $\alpha=1\%$ . Su confirmación se expresa como diferencia no significativa (N.S.).

\* Es recomendable que el lector consulte las referencias bibliográficas señaladas a lo largo del texto para abundar no sólo en el conocimiento y aplicación del análisis de la variancia, sino también en el de toda la metodología estadística utilizada en este trabajo, ya que el propósito del mismo no estubo en la conformación de un tratado sobre estadística, sino en la conceptualización práctica de esta disciplina dentro de un proceso biotecnológico.

### 2.4.3. Prueba de homogeneidad de Bartlett.

La determinación de la variabilidad en las observaciones a través de un análisis de variancia es una relación algebraica, por lo que se requiere comprobar que la suposición:

$$y_{li} = \mu + \tau_l + \varepsilon_{li}$$

es válida; de ser así, entonces el procedimiento para el análisis de la variancia es una prueba exacta de la hipótesis de *no diferencia* entre las medias de los tratamientos. Sin embargo, en la práctica, tal suposición no siempre se mantiene con exactitud. Consecuentemente, la validez del modelo debe ser evaluada mediante pruebas denominadas *exigencias del análisis de la variancia*. La más importante de ellas es la *homogeneidad*, que expresa la igualdad de la variancia en todos los tratamientos y cuya determinación es factible por varios procedimientos; el que aquí se utilizó fue la prueba de Bartlett. Esta prueba involucra elementos estadísticos cuya distribución muestral está estrechamente relacionada con la distribución de  $\chi^2$  con  $n-1$  grados de libertad, cuando las  $n$  muestras aleatorias provienen de poblaciones normales independientes [37].

La prueba estadística es:

$$\chi^2 = 2.3026 \frac{q}{c}$$

en donde:

$$q = (N-a) \log_{10} Sp^2 - \sum_{i=1}^a (n_i-1) \log_{10} S_i^2$$

$$c = 1 + \frac{1}{3(a-1)} \left[ \sum_{i=1}^a (n_i-1)^{-1} - (N-a)^{-1} \right]$$

$$Sp^2 = \frac{\sum_{i=1}^a (n_i-1) S_i^2}{N-a}$$

$S_i^2$  es la variancia muestral de la población  $i$ -ésima.

$N$  es el número total de muestras.

$a$  es el número de tratamientos.

$n$  es el número de repeticiones.

$q$  es proporcional a las diferencias entre las  $S_i^2$ , pero es cero cuando todas las  $S_i^2$  son iguales; por lo tanto, la hipótesis de *no homogeneidad* no sería refutada cuando:

$$\chi_0^2 > \chi_{\alpha, a-1}^2$$

en donde:

$\chi_{\alpha, a-1}^2$  es el punto de probabilidad de la distribución  $\chi^2$  con un nivel de confianza  $\alpha$  y  $a-1$  grados de libertad.

#### 2.4.4. Prueba de comparación apareada de Tukey.

Esta prueba es un procedimiento de comparación múltiple de medias ( $k$ ) que requiere el uso de:

$$q_{\alpha}(a, f)$$

que es el punto porcentual más alto del nivel de confianza  $\alpha$  de la distribución  $t$  de Student, para grupos de medias de tamaño  $a$  con  $f$  grados de libertad del error, para determinar el valor crítico de todas las comparaciones apareadas posibles entre las medias [37]. El intervalo  $t$  (Student) es definido como:

$$q = \frac{\bar{y}_{\max} - \bar{y}_{\min}}{\sqrt{\frac{CM_E}{n}}}$$

en donde:

$\bar{y}_{\max}$  y  $\bar{y}_{\min}$  son las medias muestrales a comparar.

$\sqrt{\frac{CM_E}{n}}$  es el error estándar ( $S_{\bar{y}_i}$ ) de cada promedio.

$CM_E$  es el cuadrado medio del error.

$n$  es el número de muestras.

La longitud del intervalo de confianza para cualquier nivel de confianza dado es mayor cuando se utiliza el estadístico de rango  $q_{\alpha}(a, f)$  que cuando se utiliza el estadístico  $t$ , puesto que el estadístico de rango tiene en cuenta la posibilidad de que cualquiera de las  $k(k-1)/2$  posibles parejas de diferencias pueda ser seleccionada en el contraste [9].

Así, la prueba de Tukey declara que dos medias son diferentes significativamente si el valor absoluto de sus diferencias muestrales excede:

$$T_{\alpha} = q_{\alpha}(a, f) S_{\bar{y}_i}$$

En todas las comparaciones se utiliza un sólo valor crítico, generalmente con un nivel de confianza del 5 % [37].

#### 2.4.5. Diseño experimental y algoritmo de Yates.

El número de experimentos elementales que requiere un diseño factorial completo ( $2^k$ ) aumenta geométricamente al crecer  $k$ . Sin embargo, cuando  $k$  es grande, la información deseada se puede obtener realizando sólo una fracción del diseño factorial completo [6, 7, 8, 9, 13, 23, 31, 37]. En esta investigación, se aplicó un diseño experimental factorial fraccionado a dos niveles, habiendo establecido, a partir de los experimentos de optimización, las condiciones de cultivo del centro experimental del diseño. La construcción de la matriz del diseño se hizo conforme al principio de los *alias* desarrollado por G. E. P. Box y J. S. Hunter [7, 8].

En los diseños factoriales  $2^k$  frecuentemente hay redundancia en la estimación de los resultados, lo cual origina, con igual frecuencia, confusiones entre los efectos. Muchas de las interacciones, entre factores, de orden superior pueden ser despreciables y algunos de los factores pueden carecer de efectos apreciables. La utilización de factoriales fraccionados puede, entonces, reducir sensiblemente el esfuerzo experimental; aunque, en general, el aumento del grado de fraccionamiento disminuye la resolución y tiende a aumentar la confusión entre los efectos de varios órdenes.

No obstante, es aquí donde el criterio, la experiencia, y la capacidad de decisión del investigador adquiere prioridad sobre la tendencia presentada por los números obtenidos durante el análisis del diseño. Este último se realiza mediante el algoritmo de Yates, y es aplicable a la matriz estándar de cualquier diseño factorial. El conocimiento, la aplicación, y la interpretación de dicho cálculo son la base de las determinaciones que son tomadas a lo largo de una investigación científica en donde se emplean diseños factoriales.

Todo diseño experimental implica tres elementos fundamentales para la investigación biotecnológica: la organización de los experimentos, el análisis de los datos obtenidos, y la construcción de modelos. El análisis del diseño mediante el algoritmo de Yates, permite establecer la influencia de los efectos de cada uno de los factores y de sus interacciones sobre las respuestas (expresados como coeficientes de regresión).

La obtención de la ecuación de un modelo matemático que define en términos estadísticos el comportamiento de un proceso biotecnológico es, sin duda, el principal enfoque que se persigue en esta investigación. Predecir la obtención de la respuesta dentro del dominio experimental, es una función trascendental del modelo obtenido.

Es así como en este trabajo se recurrió al algoritmo de Yates para calcular los coeficientes de regresión normalizados, o codificados, con los cuales se explicó físicamente la influencia de los nutrientes sobre la producción durante la optimización del medio de fermentación, y a métodos de análisis matricial para calcular los valores de los coeficientes de correlación entre factores y respuesta.

El comportamiento del sistema de fermentación fue representado gráficamente con superficies de respuesta [9, 21, 23, 37]. La representación gráfica de estas superficies de respuesta se explica dentro de la exposición y discusión de los resultados, para su mayor comprensión.

A continuación, se ilustra la matriz estándar de un diseño factorial  $2^3$  junto con el desarrollo del algoritmo:

M	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	$b_0$	Y	Tratamiento	Col. 1	Col. 2	Col. 3
													E.T.
1	-	-	-	+	+	+	-	+	1	(1)	(2+1)	(4+3)+(2+1)	1+2+3+4+5+6+7+8
2	+	-	-	-	-	+	+	+	2	a	(4+3)	(8+7)+(6+5)	-1+2-3+4-5+6-7+8
3	-	+	-	-	+	-	+	+	3	b	(6+5)	(4-3)+(2-1)	-1-2+3+4-5-6+7+8
4	+	+	-	+	-	-	-	+	4	ab	(8+7)	(8-7)+(6-5)	1-2-3+4+5-6-7+8
5	-	-	+	+	-	-	+	+	5	c	(2-1)	(4+3)-(2+1)	-1-2-3-4+5+6+7+8
6	+	-	+	-	+	-	-	+	6	ac	(4-3)	(8+7)-(6+5)	1-2+3-4-5+6-7+8
7	-	+	+	-	-	+	-	+	7	bc	(6-5)	(4-3)-(2-1)	1+2-3-4-5-6+7+8
8	+	+	+	+	+	+	+	+	8	abc	(8-7)	(8-7)-(6-5)	-1+2+3-4+5-6-7+8

$b$   
E.T./n

El modelo matemático se obtiene de la siguiente manera:

- $b_0$
- $b_1$
- $b_2$
- $b_{12}$
- $b_3$
- $b_{13}$
- $b_{23}$
- $b_{123}$

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{123}ABC$$

A, B, C=factores

Y=respuesta

b=coeficientes de regresión

M=Muestra

Col.=Columna

E.T.=efecto total

n=número de muestras

El número de columnas depende del número de factores que se evalúan



### 2.4.6. Análisis de correlación multivariable por cálculo matricial.

A partir de una matriz de diseño cualquiera, como:

Muestra	A	B	C	Y
1	-	-	-	1
2	+	-	-	2
3	-	+	-	3
4	+	+	-	4
5	-	-	+	5
6	+	-	+	6
7	-	+	+	7
8	+	+	+	8

la cual constituye la *primera matriz de variancia-covariancia*, se pueden calcular los coeficientes de correlación entre factores y respuestas que determinan la magnitud de sus interacciones intrínsecas y de su relación *causa-efecto*.

De ella se obtiene la *segunda matriz de variancia-covariancia*:

	1	2	3	4
1	$\Sigma A^2$	$\Sigma AB$	$\Sigma AC$	$\Sigma AY$
2		$\Sigma B^2$	$\Sigma BC$	$\Sigma BY$
3			$\Sigma C^2$	$\Sigma CY$
4				$\Sigma Y^2$

Para obtener la *matriz de variancia-covariancia corregida por promedio*, se resuelve la siguiente ecuación para cada elemento de la *segunda matriz de variancia-covariancia*, y cada valor obtenido se substituye en dicha matriz:

$$E - \frac{K_c \cdot K_r}{n} = E_{\text{corregido}}$$

en donde:

$E$  representa a cada elemento de la matriz.

$K_C$  es el promedio de la columna que intersecta con el elemento.

$K_r$  es el promedio del renglón que intersecta con el elemento.

$n$  es el número de muestras en el diseño experimental.

$E_{\text{corregido}}$  es el elemento corregido por promedio.

Finalmente se obtiene la matriz de *coeficientes de regresión* ( $r$ ) [21, 23], transformando a cada elemento a sus valores de  $r$  mediante la ecuación:

$$r = E_{\text{corregido}} / (Q_C \cdot Q_r)^{1/2}$$

en donde:

$Q_C$  es la covariancia de la columna que intersecta con  $E_{\text{corregido}}$ .

$Q_r$  es la covariancia del renglón que intersecta con  $E_{\text{corregido}}$ .

Las covariancias son las variancias de las variables consigo mismas, es decir, son los valores obtenidos sobre la diagonal de la matriz.

## ***PARTE III***

---

*“Sin embargo, los buenos métodos  
pueden enseñarnos a desarrollar  
las facultades con las que la naturaleza  
nos ha dotado y a servirnos de ellas  
con propósito más acertado,  
en tanto que los métodos deficientes, en cambio,  
pueden impedir que las aprovechemos.  
Así, pues, el genio de la invención,  
tan valioso en las ciencias,  
puede verse disminuido o incluso extinguido  
por un método deficiente,  
en tanto que un buen método  
puede acrecentarlo y desarrollarlo.  
En fin, un buen método favorece  
el progreso de la ciencia y pone en guardia  
a los científicos contra las numerosas fuentes de error  
que encuentran en su búsqueda de la verdad;  
éste es el único objeto del método experimental.”*

*Claude Bernard*

---

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Experimentos de optimización variando un factor a la vez.

##### 3.1.1. Fermentación *inicial*.

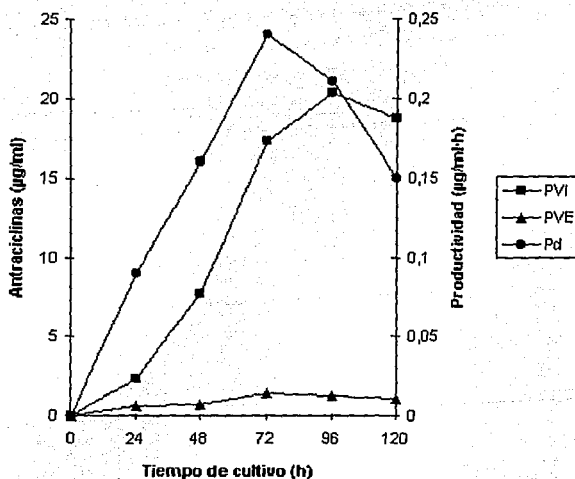
En el medio de cultivo *inicial* (medio de producción propuesto por Federico Arcamone y sus colaboradores) cuyos componentes eran de grado industrial, el microorganismo creció con dificultad y la producción de antraciclinas se manifestó con una variabilidad muy alta entre las réplicas del experimento; lo cual puede observarse en las tablas 3.1.1.1. y 3.1.1.2., y en la figura 3.1.1.1.

**Tabla 3.1.1.1. Producción y productividad volumétricas de antraciclinas intracelulares por *Streptomyces peucetius* var. *caesius* en el medio de producción *inicial* con nutrientes de grado industrial.**

Horas	Concentración de antraciclinas ( $\mu\text{g/ml}$ )	Desviación estándar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Coficiente de variación (%)	Productividad volumétrica ( $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$ )
0	0	0	0	0
24	2.3	1.54	66.9	0.09
48	7.7	2.74	35.6	0.16
72	17.3	5.79	33.5	0.24
96	20.3	5.57	27.4	0.21
120	18.7	5.34	28.5	0.15

**Tabla 3.1.1.2. Producción volumétrica de antraciclinas extracelulares por *Streptomyces peuceitius* variante *caesius* en el medio de producción inicial con nutrientes de grado industrial.**

Horas	Concentración de antraciclinas ( $\mu\text{g/ml}$ )	Desviación estándar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Coefficiente de variación (%)
0	0	0	0
24	0.66	0.10	15
48	0.75	0.23	31
72	1.43	0.09	6
96	1.23	0.22	18
120	1.05	0.32	30



**Figura 3.1.1.1. Cinéticas de producción volumétrica de antraciclinas intracelulares (PVI) y extracelulares (PVE), y productividad (Pd) de *Streptomyces peuceitius* variante *caesius* en el medio de fermentación inicial con nutrientes de grado industrial. La Pd está basada en la PVI únicamente.**

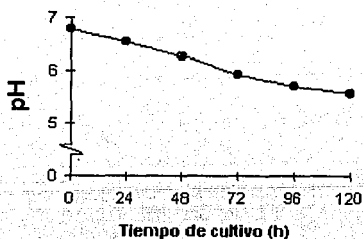
Aunque la producción máxima de antraciclinas intracelulares ( $20.3 \pm 5.57 \mu\text{g/ml}$ ) se logró a las 96 horas de fermentación, la máxima productividad ( $0.24 \mu\text{g/ml-h}$ ) se registró a las 72 horas.

La producción de antraciclinas extracelulares fue tan pequeña que se decidió no seguirla cuantificando posteriormente.

Dentro del género *Streptomyces* varios organismos excretan ácidos orgánicos cuando crecen en presencia de glucosa [1, 46]. La acidificación del medio *inicial* para *Streptomyces peucetius* variante *caesius* concuerda con esta característica a juzgar por el decremento del pH del medio a lo largo de la fermentación. Con el antecedente de que la acidez del medio de cultivo inhibe la producción de los compuestos antraciclínicos por *Streptomyces peucetius* [18], fue de suponerse que el pH juega un papel muy importante en la producción de tales compuestos por la mutante *caesius*. No obstante que la producción de antraciclinas se vió afectada, el micelio aún pudo crecer aunque no sin dificultad; esto último se evidenció por la marcada heterogeneidad en la formación de agregados y esférulas (*pellets*) miceliales en el medio. La tabla 3.1.1.3. y la figura 3.1.1.2. ilustran la cinética de pH obtenida en el medio *inicial*.

**Tabla 3.1.1.3. Cinética de pH en el medio *inicial* con nutrientes de grado industrial.**

Horas	pH	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
0	6.79	0.04	0.6
24	6.54	0.04	0.6
48	6.28	0.03	0.5
72	5.92	0.07	1
96	5.69	0.06	1
120	5.55	0.05	0.9



**Figura 3.1.1.2. Variación del pH del medio *inicial* durante el cultivo de *Streptomyces peucetius* variante *caesius*.**

Además del pH, no se descartó la posibilidad de que las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo ejercieran algún tipo de regulación sobre la síntesis de antraciclinas en *Streptomyces peucetius* variante *caesius*. Por ejemplo, es común que en los actinomicetos se presente una

represión (más que una inhibición) por la fuente de carbono (*v. gr.* el sustrato glucosa), aunque es posible que el microorganismo sea más sensible a la acidificación del medio de cultivo que a una represión catabólica por glucosa específicamente [18]. En el caso de la fuente de nitrógeno, igualmente se presenta una represión catabólica, siendo una característica muy notable en las rutas metabólicas derivadas de las síntesis de policétidos, tal como ocurre con las antraciclinas, la tetraciclina y los lípidos. Y, finalmente, se ha observado que niveles superiores a 10 mg/l de fosfato inorgánico tienen un efecto inhibitorio sobre la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius*, especialmente al inicio de la idiofase. Los mecanismos de regulación catabólica que tienen lugar en este organismo y, por supuesto, en sus mutantes, aún no han sido dilucidados fielmente [19, 20]. En las tablas 3.1.1.4., 3.1.1.5. y 3.1.1.6., y en la figura 3.1.1.3., se resumen las cinéticas de consumo de los principales nutrientes (glucosa, amonio y fósforo inorgánico), en términos de concentración remanente de cada uno de ellos en el medio *inicial*.

**Tabla 3.1.1.4. Cinética de glucosa remanente en el medio *inicial* con nutrientes de grado industrial.**

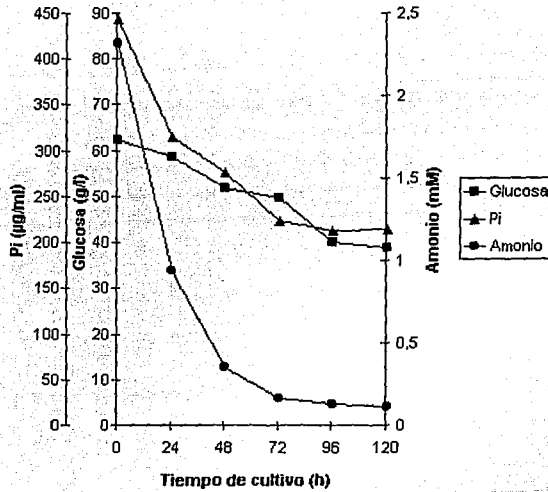
Horas	Glucosa (g/l)	Desviación estándar (g/l)	Coefficiente de variación (%)
0	62.5	2.6	4.1
24	58.6	6.5	11
48	51.8	5.3	10
72	49.6	3.2	6.5
96	40.2	3.4	8.6
120	38.9	4.0	10

**Tabla 3.1.1.5. Cinética de amonio remanente en el medio *inicial* con nutrientes de grado industrial.**

Horas	Amonio (mM)	Desviación estándar (mM)	Coefficiente de variación (%)
0	2.3	0.09	4
24	0.94	0.16	17
48	0.35	0.05	14
72	0.16	0.05	31
96	0.13	0.03	23
120	0.11	0.03	27

**Tabla 3.1.1.6. Cinética de Pi remanente en el medio inicial con ingredientes de grado industrial.**

Horas	Pi (µg/ml)	Desviación estándar (µg/ml)	Coefficiente de variación (%)
0	444	16,5	3,7
24	314	19,5	6,2
48	276	14	5,1
72	223	14	6,3
96	212	10	4,7
120	214	10	4,7



**Figura 3.1.1.3. Cinéticas de consumo de nutrientes expresadas como concentraciones remanentes de glucosa, fósforo inorgánico (Pi), y amonio en el medio inicial durante el cultivo de *Streptomyces peuceletius* variante *caesius* para la producción de antraciclinas.**

Puede observarse que se consumió un poco menos de la mitad de la concentración total de glucosa (equivalente a 23.6 g/l, aproximadamente). Para la fuente de nitrógeno se detectó un consumo equivalente a 2.2 mM de ión amonio, y para la fuente de fósforo se cuantificó un consumo de 232 µg/ml a pesar de que la concentración de 1 g/l de  $K_2HPO_4$  equivale a 178 µg de Pi en una muestra de 1 ml de la fase líquida del medio de fermentación.



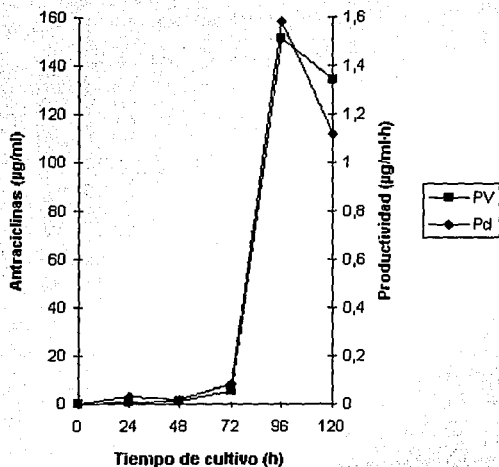
Esto pudo explicarse en el sentido de que la levadura de cerveza es una fuente compleja no solo de nitrógeno sino también de carbono y fósforo, pudiendo tener en el medio *inicial* una concentración aproximada de 1.5 g/l adicionales a 1 g/l del  $K_2HPO_4$  incluida en la formulación (según el valor de Pi calculado al inicio de la fermentación y que fue  $444 \pm 16.5 \mu\text{g/ml}$ ). Al igual que el consumo de nutrientes (con la excepción, quizá, de la fuente de nitrógeno), la medición del pH reflejó muy poca variabilidad entre las réplicas de las condiciones. La variación de dicho parámetro a lo largo de la fermentación estuvo relacionada con el consumo de glucosa; sin dejar de contemplar, claro está, la significación de la capacidad amortiguadora del medio inducida por el  $CaCO_3$ .

Las sustancias en general que tienen un grado de pureza industrial, poseen un costo varias veces menor que los reactivos con grado químicamente puro o alimentario, y pueden redituarse niveles de producción mayor que estos últimos, por lo que su inclusión en los sistemas fermentativos es sumamente atractivo. Sin embargo, en esta investigación, en el medio *inicial*, se observó lo contrario. En este estudio, simultáneamente con la fermentación en el medio *inicial* con nutrientes de grado industrial, se realizó el cultivo de *Streptomyces peucetius* variante *caesi*us en un medio con la misma formulación del medio *inicial* pero cuyos reactivos eran de grado analítico y grado alimentario. Dicha fermentación se llevó a cabo para evaluar la producción y la productividad de antraciclinas reduciendo lo más posible la influencia de otros factores químicos presentes en los reactivos y nutrientes industriales que pudieran afectar el metabolismo del microorganismo. Como puede observarse en la tabla 3.1.1.7. y en la figura 3.1.1.4., para el medio *inicial* con nutrientes de grado analítico y alimentario, únicamente se cuantificaron la producción y la productividad volumétricas para antraciclinas, detectándose el máximo valor para ambas a las 96 horas de fermentación ( $151 \pm 28.7 \mu\text{g/ml}$  y  $1.6 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$ , respectivamente). Es evidente que el grado de pureza de los componentes del medio influyó notablemente la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesi*us, dadas las diferencias entre los resultados obtenidos en ambos medios.

**Tabla 3.1.1.7. Producción y productividad volumétricas de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesi*us en el medio de producción *inicial* con nutrientes de grado analítico y alimentario.**

Horas	Concentración de antraciclinas ( $\mu\text{g/ml}$ )	Desviación estándar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Coefficiente de variación (%)	Productividad volumétrica ( $\mu\text{g/m}^3\cdot\text{h}$ )
0	0	0	0	0
24	0.85	0.23	27	0.03
48	1.0	0.21	21	0.02
72	5.6	1.6	28	0.08
96	151	28.7	18.9	1.6
120	134	15.2	11.3	1.1

Además de haber rendido una mayor producción, la variabilidad de este parámetro, expresada como coeficiente de variación ( $CV$ ), en el medio con nutrientes de grado analítico y alimentario ( $CV=18.9\%$ ), fue menor que la expresada en el medio industrial ( $CV=27.4\%$ ), a las 96 horas de fermentación.



**Figura 3.1.1.4.** Producción volumétrica (PV) de antraciclina y productividad (Pd) de *Streptomyces peucetius* variante *caestus* en el medio inicial con nutrientes de grado analítico y alimentario.

No obstante, el interés principal de esta investigación fue el de optimizar el medio de cultivo con nutrientes de grado industrial, por lo que de aquí en adelante se trabajó únicamente con dichos nutrientes.

### 3.1.2. Evaluación de la concentración de la levadura de cerveza.

Ya que la levadura de cerveza fue el único nutriente indefinido químicamente en el medio de fermentación, era prudente modificar su concentración en el medio con nutrientes de grado industrial (antes que la de cualquier otro nutriente), con la intención de establecer una condición que favoreciera un crecimiento uniforme, así como una mayor producción volumétrica de antraciclina, y un decremento en la relación de variabilidad estadística entre las repeticiones de cada experimento.

Como complemento a lo anterior, la utilización de *perlas de vidrio* dentro de los matraces con deflectores en su base, permitió una disgregación homogénea del micelio, incrementando así la transferencia de masa y, al mismo tiempo, facilitando la cuantificación de la biomasa.

Mediante el uso de las *perlas de vidrio*, se evitó exitosamente la formación de agregados miceliales (*pellets*), que habrían dificultado enormemente el trabajo experimental, generando, además, resultados poco confiables. En este sentido, se determinó utilizar 2 perlas (con diámetro de 5 mm cada una) en los matraces de los medios de producción, y esta técnica fue también aplicada al crecimiento del preinóculo, con 10 perlas en cada matraz.

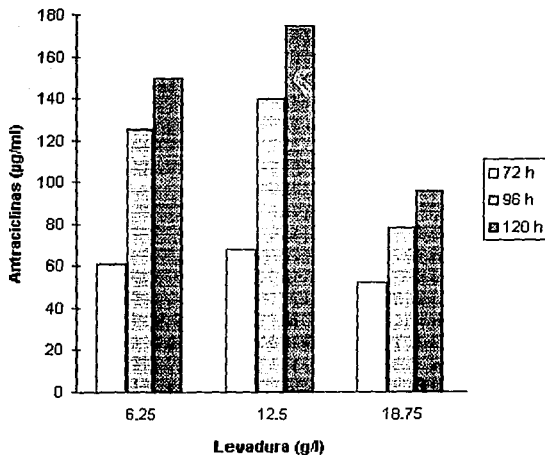
Una vez que se fijaron las nuevas condiciones de crecimiento, se establecieron las siguientes condiciones experimentales, definidas por diferentes concentraciones de levadura de cerveza en el medio de fermentación con nutrientes de grado industrial: 18.75, 12.5, y 6.25 g/l. Tales concentraciones de levadura de cerveza se obtuvieron al dividir en cuartas partes la concentración *inicial*; criterio adoptado con el supuesto de que existen factores inherentes a la complejidad química de la levadura, así como a una excesiva concentración de nitrógeno, que pueden ejercer una influencia negativa durante el metabolismo de *Streptomyces peucetius* variante *caesius*. Por esta razón, fue necesario sondear a primera vista el efecto de la levadura de cerveza sobre la producción de antraciclinas de acuerdo con su variación constitutiva en el medio, por lo que se determinó que, separando en cuartas partes la concentración *inicial*, era factible tener un dominio experimental pleno y verosímil que permitiera establecer la concentración de la levadura de cerveza con la cual se daría inicio a la optimización del medio de cultivo. En la tabla 3.1.2.1. y en la figura 3.1.2.1. puede hacerse un seguimiento parcial (a las 72, 96, y 120 horas de fermentación) de la cinética de producción volumétrica de antraciclinas, según las diferentes concentraciones de levadura de cerveza que se evaluaron.

**Tabla 3.1.2.1. Efecto de la concentración de la levadura de cerveza en el medio de cultivo sobre la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius*, a las 72, 96, y 120 horas de fermentación.**

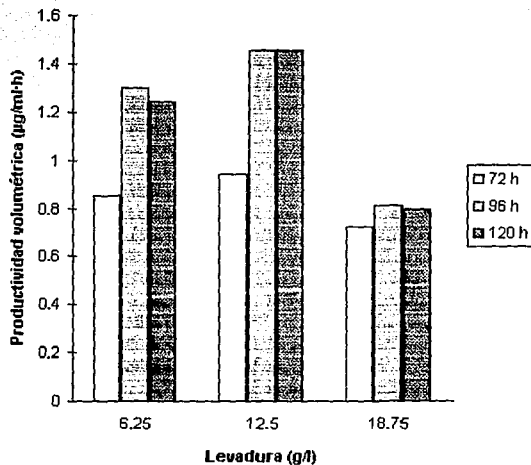
Horas	6.25 g/l de levadura		12.50 g/l de levadura		18.75 g/l de levadura	
	Concentración de antraciclinas (µg/ml)	Coefficiente de variación (%)	Concentración de antraciclinas (µg/ml)	Coefficiente de variación (%)	Concentración de antraciclinas (µg/ml)	Coefficiente de variación (%)
72	61.2 ± 10.2	16.7	67.4 ± 8.5	12.5	52.0 ± 8.8	16.9
96	125 ± 6.9	5.5	140 ± 14.6	10.5	77.6 ± 8.6	11.0
120	149 ± 9.9	6.6	174 ± 15.3	8.8	95.5 ± 14.1	14.8

En este experimento, la producción volumétrica fue en aumento conforme avanzó el tiempo de fermentación. No obstante, la productividad alcanzó su valor máximo alrededor de las 96 horas, tal como puede verse en la figura 3.1.2.2.

En la tabla 3.1.2.2. y en la figura 3.1.2.3. puede observarse que la cantidad de biomasa no resultó afectada por la variación de la concentración de levadura, especialmente entre 6.25 y 12.50 g/l, de las 96 horas de fermentación en adelante, por lo que la cantidad de biomasa no se consideró como criterio de decisión para la evaluación de la concentración de levadura sobre la producción de antraciclinas.



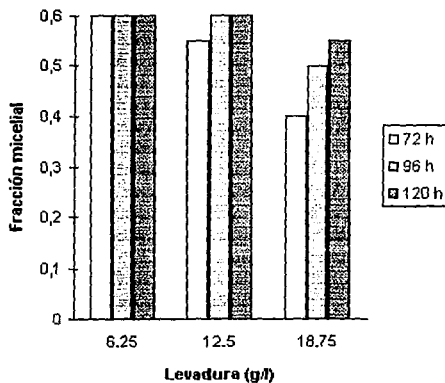
**Figura 3.1.2.1.** Producción de antraciclina por *Streptomyces peucetius* variante *caesius*: al variar la concentración de la levadura de cerveza del medio inicial en 6.25, 12.50, y 18.75 g/l, y a las 72, 96 y 120 horas de fermentación.



**Figura 3.1.2.2.** Productividad de *Streptomyces peucetius* variante *caesius* con diferentes concentraciones de levadura de cerveza en el medio inicial.

**Tabla 3.1.2.2. Cantidad de biomasa expresada como fracción micelial (f. m.) sedimentada en el medio de cultivo durante la evaluación de la variación de la concentración de levadura.**

Concentración de levadura g/l	72 h de fermentación (f. m.)	96 h de fermentación (f. m.)	120 h de fermentación (f. m.)
6.25	0.60	0.60	0.60
12.50	0.55	0.60	0.60
18.75	0.40	0.50	0.55



**Figura 3.1.2.3. Cantidad de biomasa expresada como fracción micelial con 6.25, 12.5, y 18.75 g/l de levadura de cerveza en el medio de cultivo, a las 72, 96, y 120 horas de fermentación.**

Con base en estos resultados, se determinó cual sería el tiempo fijo, de aquí en adelante, en el que se realizarían las evaluaciones de la optimización del medio. La producción volumétrica mostró una tendencia a seguir incrementándose en tiempos más prolongados de fermentación, mientras que la productividad, en la mayoría de los experimentos hasta aquí realizados, alcanzó los valores más altos a las 96 horas de cultivo. Fue éste el tiempo fijado para llevar a cabo la optimización.

Los resultados obtenidos en este experimento demostraron que al reducir la concentración de la levadura de cerveza, no solamente se incrementó notablemente la producción de antraciclinas, sino que además la variabilidad entre las repeticiones de cada una de las condiciones se redujo substancialmente. Es por esto que el inicio de la optimización del medio de cultivo consistió en elegir la concentración de la levadura de cerveza que permitiera trabajar con niveles de producción fácilmente cuantificables (más de 50 µg/ml de antraciclinas), y con una alta

confiabilidad de los resultados dada por la menor variabilidad respecto del medio *inicial*. Para definir formalmente dicha concentración se aplicó un análisis de variancia y la prueba de comparación apareada de Tukey, cuyos resultados se expresan en la tabla 3.1.2.3.

Con el análisis de variancia se determinó que los niveles de producción entre las condiciones evaluadas eran diferentes significativamente, y con la prueba de Tukey se especificó que entre 12.5 y 6.25 g/l de levadura se encontraba la mejor condición de producción, descartando definitivamente la concentración de 18.75 g/l.

**Tabla 3.1.2.3. Análisis de variancia y prueba de Tukey para la producción volumétrica de antracilinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius*, al variar la concentración de la levadura de cerveza en el medio *inicial* con nutrientes de grado industrial, a las 96 horas de fermentación.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F estimada	F crítica $\alpha_{0,05}$	Significancia
Tratamientos	2	10462.83	5231.41	46.84	3.89	*
Error	12	1340.09	111.67			
Total	14	11802.91				

Prueba de Bartlett: 0.33 ( $\chi^2_{\alpha_{0,05}} = 5.99$ )

\*=Significativo

**Prueba de Tukey  $\alpha_{0,05}$ :**

Condición (g/l de lev.)	Repeticiones	Promedio	Homogeneidad entre tratamientos
18.75 g/l	5	77.65	a
6.25 g/l	5	125	b
12.5 g/l	5	139.50	b

Dentro del margen de error experimental intrínseco al proceso, el experimento mostró una tendencia a disminuir la cantidad de levadura, lo cual no solamente representa una reducción en el costo del medio, sino que, además, la producción se ve incrementada en casi el 100%. Fueron dos los criterios fundamentales que se tomaron en cuenta para elegir la concentración de 12.5 g/l de levadura como punto de partida para la optimización: en primer lugar, la productividad fue siempre mayor con esta concentración; y en segundo término, la modificación de la concentración de levadura hasta 12.5 g/l es un punto medio en su concentración *inicial*, lo cual permitió tener un panorama experimental amplio y seguro. Es así como no se consideró la concentración de 6.25 g/l como inicio de la optimización ya que ello implicaba un porcentaje tan alto como el riesgo de pasar inadvertidos los efectos atribuibles a otras concentraciones intermedias de la misma levadura. De cualquier manera, el análisis de un diseño factorial

fraccionado, aplicado posteriormente, establecería, formalmente, la tendencia para modificar la concentración de la levadura. Y ya que la producción de antraciclinas con 18.75 g/l de levadura no fue tan alta como con 12.5 g/l, fue esta última la elegida como el primer paso de la optimización del medio de fermentación. Como se mencionó anteriormente, la productividad es un parámetro relativo que puede ser empleado como un criterio de definición para el establecimiento de condiciones en el proceso fermentativo. Sin embargo, para llevar a cabo la optimización del medio de cultivo es preferible hacerlo en términos de una respuesta absoluta, tal como lo es la producción volumétrica; en este caso el parámetro relativo expresa una respuesta o variable dependiente (producción volumétrica) en función de una constante (tiempo de fermentación). Mientras que la producción volumétrica sigue un patrón de respuesta definible y pronosticable en primera instancia, la productividad no mantiene forzosamente una proporcionalidad directa con el curso cinético de aquella, por lo que la interpretación de las estimaciones calculadas durante la optimización podría haber sido confusa. Considerése simplemente que, aunque la producción siga aumentando, la productividad puede decrecer.

### 3.1.3. Evaluación de la concentración de las sales minerales.

En la levadura de cerveza también se encuentran sales inorgánicas que *Streptomyces peucetius* variante *caesi* puede seguramente asimilar. Como en la formulación del medio de cultivo se incluyen algunas sales minerales, era necesario conocer su importancia para la producción de antraciclinas, y más todavía después de haber modificado la concentración de la levadura de cerveza. Por lo tanto, el siguiente experimento consistió en evaluar el efecto que tendría sobre la producción eliminar una sal cada vez, y así obtener datos independientes para cada compuesto. Los resultados esquematizados en la figura 3.1.3.1. fueron obtenidos a las 96 horas de fermentación y cuantificados como producción volumétrica.

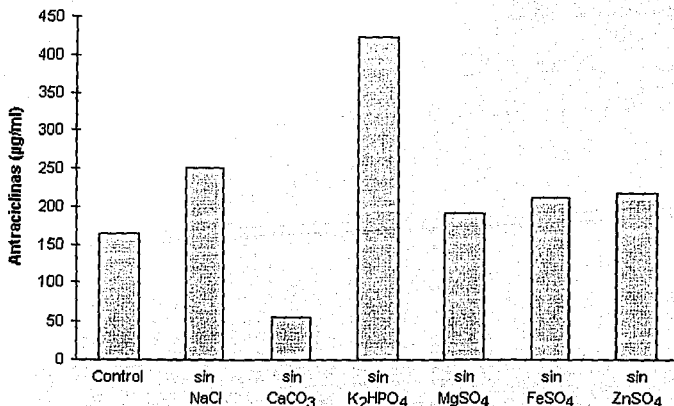


Figura 3.1.3.1. Efecto de la eliminación de cada sal mineral de la formulación del medio inicial sobre la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesi*. El medio Control contiene todas las sales minerales de la formulación.

De este experimento se infirió que únicamente el  $\text{CaCO}_3$  es imprescindible para la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius*; en cambio, las demás sales no solamente no fueron necesarias en la formulación del medio de fermentación sino que al no haber sido incluidas, la producción se incrementó ligeramente en relación con el medio de cultivo *control*, el cual contenía todas las sales. Dicho incremento varió desde  $191 \pm 14$   $\mu\text{g/ml}$  para la condición sin  $\text{MgSO}_4$ , hasta  $250 \pm 12$   $\mu\text{g/ml}$  para la condición sin  $\text{NaCl}$ . Por supuesto que aunque estos resultados no fueron concluyentes (por no haber considerado las interacciones entre los componentes mediante un esquema ortogonal), sí dieron una idea general de la significación de los componentes inorgánicos en el medio, especialmente del  $\text{CaCO}_3$  ( $56.9 \pm 2.8$   $\mu\text{g/ml}$  para la condición sin  $\text{CaCO}_3$ ), y del  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  cuya exclusión de la formulación incrementó significativamente la producción volumétrica ( $423 \pm 28$   $\mu\text{g/ml}$ ), lo cual coincidió con el efecto inhibitorio de los iones fosfato sobre la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius*, ya señalada con anterioridad. La variabilidad entre las repeticiones bajo estas condiciones se mantuvo baja respecto del medio *inicial* lo cual fue atribuido a la modificación hecha anteriormente con la concentración de la levadura de cerveza, obteniéndose un *CV* máximo de 7.2 % entre repeticiones. El análisis de variancia y la prueba de comparación de medias de Tukey resumidos en la tabla 3.1.3.1. confirmaron la diferenciación que distingue la trascendencia de cada una de las sales minerales del medio sobre la producción volumétrica de antraciclinas por la mutante *caesius*.

En dicha tabla se percibe que, la eliminación de las sales  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ , y  $\text{ZnSO}_4$  tuvieron un efecto similar sin modificar significativamente la producción, mientras que las demás pueden repercutir de manera importante la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius*, ya sea por su ausencia en la formulación (como en el caso del  $\text{CaCO}_3$ ) o por su presencia en la misma (como ocurrió con el  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).

**Tabla 3.1.3.1. Análisis de variancia y prueba de Tukey para la producción volumétrica de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius*, eliminando una sal mineral cada vez en el medio *inicial* con nutrientes de grado industrial, a las 96 horas de fermentación.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F estimada	F crítica $\alpha_{0.05}$	Significancia
Tratamientos	5	208249.25	41649.85	203.47	3.11	*
Error	12	2456.33	204.70			
Total	17	210705.58				

Prueba de Bartlett:  $0.10 (\chi^2 \alpha_{0.05} = 11.07)$

\*=Significativo; N.S.=No significativo  
(Continúa)



**Tabla 3.1.3.1. Análisis de variancia y prueba de Tukey para la producción volumétrica de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius*, eliminando una sal mineral cada vez en el medio inicial con nutrientes de grado industrial, a las 96 horas de fermentación (continuación).**

Prueba de Tukey  $\alpha_{0,05}$ :

Condición (tipo de sal)	Repeticiones	Promedio	Homogeneidad entre tratamientos
sin CaCO <sub>3</sub>	3	56.9	a
sin MgSO <sub>4</sub>	3	191	b
sin FeSO <sub>4</sub>	3	210	b
sin ZnSO <sub>4</sub>	3	216	bc
sin NaCl	3	250	c
sin K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	423	d

### 3.1.4. Evaluación de la concentración de la glucosa.

Considerando la acidogénesis del medio de producción, inducida por altas concentraciones de glucosa, se evaluó el efecto de la misma sobre la producción dividiendo la concentración inicial en cuartas partes, tal y como se hizo con la levadura de cerveza. De esta forma, y con la concentración de levadura reducida a la mitad, se probaron las siguientes concentraciones de glucosa: en g/l; 45, 30, y 15. Como puede apreciarse en la figura 3.1.4.1., a las 96 horas de fermentación la concentración de 30 g/l de glucosa permitió casi duplicar la producción volumétrica (780 ±27 µg/ml) respecto del experimento en donde se eliminó el K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> de la formulación del medio.

Según las cuantificaciones de la glucosa remanente en el medio de cultivo evaluadas en el análisis de variancia y en la prueba de comparación de medias de Tukey que aparecen en la tabla 3.1.4.1., la concentración de 30 g/l es la que *Streptomyces peucetius* variante *caesius* requiere para producir altos índices de antraciclinas. Por ejemplo, en la condición de 15 g/l de glucosa, el consumo de ésta fue calculado como 14.7 ±0.6 g/l; para la condición de 30 g/l, se calculó un consumo de 27.6 ±0.1 g/l; y de 45 g/l en la formulación, se consumieron 34.6 ±0.2 g/l. Es decir, no es necesario usar una concentración tan alta como 60 g/l de glucosa en el medio para lograr una producción importante de antraciclinas; incluso, se supuso que la concentración óptima de glucosa estaría entre 15 y 45 g/l; sin olvidar, claro está, que la concentración de levadura en este experimento fue de 12.5 g/l.

Así, para iniciar el estudio de la fermentación mediante un diseño experimental, se decidió tomar como punto de partida (centro experimental) 30 g/l de glucosa por ser la concentración que redujo la más alta concentración de antraciclinas y porque, al igual que con la levadura de cerveza, resultó ser la mitad de la concentración del medio inicial, lo cual permitió tener un mejor panorama experimental para la aplicación del diseño. La prueba de Tukey confirmó que 30 g/l de glucosa fue la concentración a elegir, sin lugar a dudas, para el inicio de los estudios con el diseño experimental. Al mismo tiempo, se observó que la acidez del medio de cultivo tiende a disminuir conforme la concentración de glucosa es menor, como puede verse en la figura 3.1.4.2.

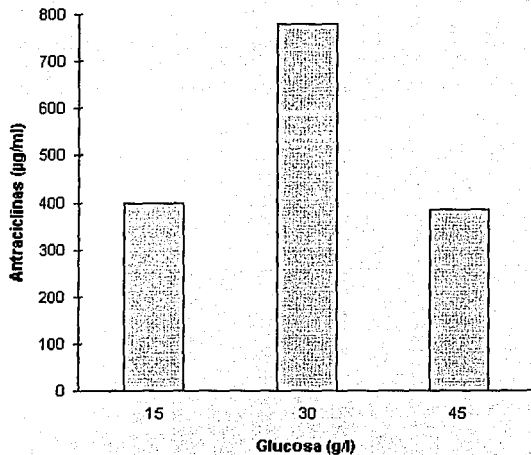


Figura 3.1.4.1. Efecto de diferentes concentraciones de glucosa sobre la producción de antraciclina por *Streptomyces peucetius* variante *caesi* en el medio de fermentación con nutrientes de grado industrial.

Tabla 3.1.4.1. Análisis de variancia y prueba de Tukey para la producción volumétrica de antraciclina por *Streptomyces peucetius* variante *caesi*, al variar la concentración de glucosa en el medio inicial con nutrientes de grado industrial, a las 96 horas de fermentación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F estimada	F crítica $\alpha_{0,05}$	Significancia
Tratamientos	2	303611.65	151805.83	273.19	5.14	*
Error	6	3334.05	555.67			
Total	8	306945.70				

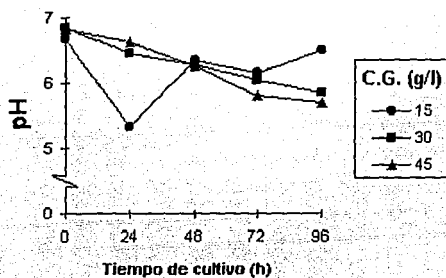
Prueba de Bartlett: 0.48 ( $\chi^2$   $\alpha_{0,05} = 5.99$ )

\*=Significativo; N.S.=No significativo  
(Continúa).

**Tabla 3.1.4.1. Análisis de variancia y prueba de Tukey para la producción volumétrica de antraciclinas por *Streptomyces peuceitius* variante *caesius*, al variar la concentración de glucosa en el medio inicial con nutrientes de grado industrial a las 96 horas de fermentación (continuación).**

Prueba de Tukey  $\alpha_{0,05}$ :

Condición (g/l de gluc.)	Repeticiones	Promedio	Homogeneidad entre tratamientos
45	3	382	a
15	3	399	a
30	3	780	b



**Figura 3.1.4.2. Cinéticas de pH durante la fermentación en el medio de producción de antraciclinas con diferentes concentraciones de glucosa (C.G.).**

Lo anterior vino a confirmar que la acidogénesis en el medio inicial se debe fundamentalmente a los ácidos orgánicos producidos por el metabolismo del carbohidrato. Por otra parte, aunque la curva de pH descrita en la condición de 15 g/l de glucosa es la que se ha adoptado como la cinética típica en cultivos de *Streptomyces peuceitius* y otras especies productoras de antraciclinas [18], no le correspondió a dicha condición la mejor producción volumétrica. Los estudios realizados en este aspecto, establecen que el decremento inicial del pH ocurre entre las primeras 24 y 48 horas de fermentación, es decir, justo antes de iniciarse la fase estacionaria del crecimiento del microorganismo; si este tiempo se prolonga, entonces es probable que el medio se acidifique. Sin embargo, si el pH se incrementa después de este periodo, la producción de antraciclinas tiene lugar [18, 19].

Los resultados obtenidos en la evaluación de las diferentes concentraciones de glucosa, confirman lo que se mencionó anteriormente sobre la acidogénesis del medio a partir de altas concentraciones del azúcar, pero además indican que el incremento de la producción volumétrica no depende solamente del sostenimiento del pH propicio, sino también de la cantidad de glucosa disponible como sustrato.

Entre algunos experimentos relacionados con la variación de la concentración de glucosa, se midió la biomasa como la fracción sedimentada que ocupa el micelio en el medio de cultivo. A las 96 horas de fermentación la cantidad de biomasa fue constante, por lo que no se consideró como una variable determinante durante la evaluación del efecto de la concentración de glucosa sobre la producción.

Fue así como se evaluaron siete experimentos al azar en donde los medios de cultivo y las condiciones de incubación estaban conformados de la siguiente manera:

- Condición 1: glucosa 30 g/l; levadura de cerveza 12.5 g/l; sales (sin fosfato); 150 rpm; 10 perlas de vidrio por cada matraz; 29°C.
- Condición 2: glucosa 15 g/l; levadura de cerveza 12.5 g/l; sales (sin fosfato); 150 rpm; 3 perlas de vidrio por cada matraz; 29°C.
- Condición 3: glucosa 45 g/l; levadura de cerveza 12.5 g/l; sales (sin fosfato); 150 rpm; 3 perlas de vidrio por cada matraz; 29°C.
- Condición 4: glucosa 30 g/l; levadura de cerveza 12.5 g/l; CaCO<sub>3</sub> 2 g/l; 150 rpm; 2 perlas de vidrio por cada matraz; 29°C.
- Condición 5: glucosa 30 g/l; levadura de cerveza 12.5 g/l; CaCO<sub>3</sub> 2 g/l; 180 rpm; 2 perlas de vidrio por cada matraz; 29°C.
- Condición 6: glucosa 30 g/l; levadura de cerveza 12.5 g/l; CaCO<sub>3</sub> 2 g/l; 200 rpm; 2 perlas de vidrio por cada matraz; 29°C.
- Condición 7: glucosa 15 g/l; levadura de cerveza 12.5 g/l; CaCO<sub>3</sub> 2 g/l; 180 rpm; 2 perlas de vidrio por cada matraz; 29°C.

A continuación se expresan las fracciones equivalentes a la biomasa contenida en el medio de cultivo:

Condición	fracción
1	0.69 ±0.07
2	0.67 ±0.05
3	0.67 ±0.09
4	0.72 ±0.02
5	0.69 ±0.07
6	0.71 ±0.05
7	0.66 ±0.02

Considerando la cuantificación de la fracción micelial que se realizó al variar la concentración de la levadura de cerveza, y la obtenida en esta última fase de la investigación, se determinó que la cantidad de biomasa sería una constante durante el desarrollo de estos estudios, por lo cual, el incremento y la evaluación de la producción se darían, únicamente, en función de la concentración de los componentes del medio de cultivo.

### 3.1.5. Medio de fermentación modificado.

Es así, finalmente, que el medio de fermentación *inicial* fue modificado en la concentración de los dos componentes orgánicos: la levadura de cerveza pasó de 25 g/l a 12.5 g/l, y la glucosa se redujo de 60 g/l hasta 30 g/l. En cuanto a las sales inorgánicas que complementan la formulación, se decidió eliminar el  $\text{FeSO}_4$  y el  $\text{ZnSO}_4$  ya que su inclusión no resultó importante para la producción de antraciclinas, además de que representarían dos factores más en el diseño, lo cual incrementaría el número de experimentos potenciales a realizar y, por ende, el grado de confusión de los efectos. Independientemente de que el  $\text{NaCl}$  y el  $\text{MgSO}_4$  hayan mostrado alguna influencia sobre la producción volumétrica, se decidió mantenerlas en la composición del medio debido a que sus respectivas concentraciones son lo suficientemente cuantificables para evaluarlas dentro de un diseño experimental y, por lo tanto, determinar cuantitativamente su efecto sobre la producción. Obviamente, el  $\text{CaCO}_3$  fue mantenido en su concentración *inicial*; mientras que el  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  no fue eliminado de la formulación a pesar de que anteriormente se observó que presentaba un efecto inhibitorio sobre la producción de antraciclinas. El propósito de incluirlo en una concentración de 0.1 g/l fue el de cuantificar su efecto real sobre la producción, y así obtener, al igual que los demás nutrientes, los coeficientes de regresión que determinan el grado de importancia que cada uno de ellos tiene sobre la producción de antraciclinas bajo un esquema ortogonal, como lo es un diseño factorial fraccionado. El nuevo medio de fermentación así conformado fue designado como *mM1 (medio Modificado 1)*.

## 3.2. Desarrollo del diseño experimental.

### 3.2.1. Diseño factorial fraccionado.

Para concluir el estudio de optimización del medio de fermentación, constituido ahora, en g/l, por: glucosa, 30; levadura de cerveza, 12.5;  $\text{NaCl}$ , 2;  $\text{CaCO}_3$ , 2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1; y  $\text{MgSO}_4$ , 0.1; se aplicó un diseño factorial fraccionado  $2^{6-3}$ , representado por la matriz de diseño de la tabla 3.2.1.1.

Si se hubiese aplicado un diseño factorial completo para la evaluación de los seis nutrientes señalados con anterioridad, habría sido necesario realizar 64 experimentos ( $2^6$ ), sin considerar las repeticiones para cada uno de ellos, lo cual resultó incompatible con la práctica experimental. Fue esta la razón por la cual se decidió aplicar un diseño factorial fraccionado que contuviera un número mínimo de experimentos que permitiera evaluar confiablemente la mayor parte de los factores, incluyendo, por supuesto, aquellos que hasta este momento se habían manifestado como los más influyentes sobre la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesiuis*. Además, los diseños factoriales fraccionados ofrecen la ventaja de aportar las principales tendencias del comportamiento del fenómeno que se está estudiando, realizando una cantidad pequeña, pero significativa, de experimentos. No es casual que en la práctica industrial sea uno de los métodos más empleados para incrementar la producción y evaluar, sobre una base de pronósticos, el desarrollo de sus procesos.

**Tabla 3.2.1.1. Matriz del diseño 2<sup>6-3</sup> (en unidades reales) para la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius*.**

Condición	1	2	3	4=12	5=13	6=23	Producción de antraciclinas
	Glucosa	Levadura	NaCl	CaCO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	
1	25	9.37	0	3	0.1	0.2	615
2	35	9.37	0	1	0	0.2	573
3	25	15.63	0	1	0.1	0	330
4	35	15.63	0	3	0	0	654
5	25	9.37	4	3	0	0	704
6	35	9.37	4	1	0.1	0	498
7	25	15.63	4	1	0	0.2	301
8	35	15.63	4	3	0.1	0.2	683
<i>b</i>	57.42	-52.64	1.73	119.20	-13.26	-1.73	544.93
							Desviación estándar ± 25.37
u.r.	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	µg/ml
(+)	35	15.63	4	3	0.1	0.2	
(-)	25	9.37	0	1	0	0	
c.e.	30	12.5	2	2	0.05	0.1	
u.e.	5	3.13	2	1	0.05	0.1	
ref.*	experim	experim	Arcam	Arcam	experim	Arcam	

u.r.=unidades reales

(+)=nivel superior

(-)=nivel inferior

c.e.=centro experimental

u.e.=unidad experimental

ref.=referencia de los datos [Arcamone y col. [2, 3] (Arcam); y experimental (experim)]

En relación con la matriz de diseño de la tabla 3.2.1.1., las combinaciones ortogonales correspondientes con CaCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y MgSO<sub>4</sub> se derivaron de los *alias* expresados con las identidades 4=12, 5=13 y 6=23, respectivamente. Inmediata a la matriz del diseño, se incluyen los valores de los coeficientes de regresión (*b*) que cuantifican el efecto que cada nutriente ejerce sobre la producción de antraciclinas, así como el que se define como la media de la producción (544.93 µg/ml) y que representa el valor codificado del coeficiente de regresión del término independiente (o constante) que engloba el efecto total de todo aquello que afecta a la producción y que es ajeno al dominio experimental, pero que permanece constante. Cada uno de los índices de producción se encuentra expresado como el promedio de las repeticiones de cada condición.

En la tabla 3.2.1.1. también se exponen las unidades reales en que se utilizó cada factor, los niveles que delimitan el espacio experimental para cada uno de ellos, y las unidades experimentales que incrementaron o decrecieron los centros experimentales, los cuales representan las concentraciones de los nutrientes en el *mM*. Las referencias indican las fuentes, tanto de información como experimentales, que determinaron las condiciones señaladas como centros experimentales. La significancia de los efectos de los nutrientes fue establecida con base en la desviación estándar global (*s*=25.37), con un nivel de confianza del 95 %. Aquí es preciso señalar que la significancia de *b* es relativa ya que, generalmente, no es fácil establecer un

criterio universal para determinarla; sin embargo, para esta investigación, se tomó como punto de referencia el valor de  $s$ . El cálculo de los coeficientes de regresión normalizados se llevó a cabo mediante el algoritmo de Yates.

### 3.2.2. Análisis de correlación multivariable.

Como pudo observarse en la tabla 3.2.1.1., los valores de  $b$  significativos fueron los correspondientes a glucosa (57.42), levadura de cerveza (-52.64), y  $\text{CaCO}_3$  (119.20), sin efectos significativos para sus interacciones apareadas y múltiples. Para  $\text{NaCl}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , y  $\text{MgSO}_4$  no se registraron efectos importantes.

Para confirmar el grado de influencia de los nutrientes sobre la producción de antraciclinas, se realizó el siguiente análisis de correlación multivariable por cálculo matricial:

	Glucosa	Levadura	NaCl	CaCO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	Producción	
Matriz de variancias-covariancias	Glucosa	7400.00	3000.00	480.00	480.00	12.00	24.00	133079.90
	Levadura		1328.13	200.00	200.00	5.00	10.00	53177.00
	NaCl			64.00	32.00	0.80	1.60	8746.56
	CaCO <sub>3</sub>				40.00	0.80	1.60	9672.50
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>					0.04	0.04	212.67
	MgSO <sub>4</sub>						0.16	434.56
	Producción							2545426.53

	Glucosa	Levadura	NaCl	CaCO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	Producción	
Matriz de variancias-covariancias corregida por promedio	Glucosa	200.00	0	0	0	0	0	2296.70
	Levadura		78.13	0	0	0	0	-1316.00
	NaCl			32.00	0	0	0	27.68
	CaCO <sub>3</sub>				8.00	0	0	953.62
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>					0.02	0	-5.31
	MgSO <sub>4</sub>						0.08	-1.38
	Producción							169836.89

	Glucosa	Levadura	NaCl	CaCO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	Producción	
Matriz de correlaciones (r)	Glucosa	1.00	0	0	0	0	0	0.39
	Levadura		1.00	0	0	0	0	-0.36
	NaCl			1.00	0	0	0	0.01
	CaCO <sub>3</sub>				1.00	0	0	0.82
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>					1.00	0	-0.09
	MgSO <sub>4</sub>						1.00	-0.01
	Producción							1.00

Este análisis dio como resultado una influencia muy importante del  $\text{CaCO}_3$  sobre la producción de antraciclinas ( $r=0.82$ ), y una influencia menor por parte de la glucosa y la levadura ( $r=0.39$  y  $r=-0.36$ , respectivamente), sin que se presentaran factores o respuestas espurios. El resto de los nutrientes no mostraron efectos significativos sobre la producción; de tal modo que, efectivamente, los factores más importantes en la producción de antraciclinas por

*Streptomyces peucetius* variante *caesius* fueron la glucosa, la levadura de cerveza, y el  $\text{CaCO}_3$ , considerándose a los demás nutrientes dispensables.

### 3.2.3. Modelo matemático de la producción de antraciclina por *Streptomyces peucetius* variante *caesius*.

Es así como se definió el siguiente modelo matemático que mejor explicó la producción de antraciclina por *Streptomyces peucetius* variante *caesius* en el *mMI*:

$$y = b_0 + b_1A - b_2B + b_3C$$

en donde:

$y$  es la producción pronosticada por el modelo.

$b_0$  es el término independiente que se define como la media de producción.

$b_1, b_2,$  y  $b_3$  son los coeficientes de regresión de cada factor.

$A, B,$  y  $C$  son las unidades normalizadas de los factores, cuyas claves son:

$A$  corresponde a glucosa.

$B$  corresponde a levadura de cerveza.

$C$  corresponde a  $\text{CaCO}_3$ .

substituyendo con los valores de  $b$  en la ecuación:

$$y = 544.93 + 57.42 A - 52.64 B + 119.20 C$$

El modelo así obtenido indica que la producción de antraciclina por *Streptomyces peucetius* variante *caesius* en el *mMI*, sigue un comportamiento lineal, lo cual se traduce en que cada uno de los factores  $A, B,$  y  $C,$  de manera independiente, ejerce un efecto sobre la producción, sin que entre ellos exista interacción alguna (ya demostrado en el análisis de correlación multivariable).

A primera vista, se detectó en el modelo matemático un efecto positivo de la glucosa y del  $\text{CaCO}_3$ , siendo éste el factor más influyente; mientras que la concentración de la levadura de cerveza es excesiva, según el valor negativo del coeficiente de regresión para este nutriente. Esto último definió la tendencia a reducir, aún más, la concentración de la levadura en el medio de cultivo, lo cual se había observado anteriormente (véase la sección 3.1.2.).

Este es un modelo matemático normalizado, o codificado, que facilita la representación gráfica del fenómeno (ver más adelante). Sin embargo, para determinar el grado de explicación que posee el modelo sobre la producción, es necesario calcular los coeficientes de regresión en términos de unidades reales.



Para ello se utilizaron las siguientes ecuaciones:

para los valores de  $b$  de los factores:

$$b = \frac{\sum xy - \sum x \sum y / n}{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n}$$

y para  $b_0$  (se despeja de la ecuación):

$$\sum y = b_0 n + b_1 \sum x_1 + b_2 \sum x_2 + b_3 \sum x_3$$

en donde:

$n$  es el número de condiciones.

$x$  es el valor de los niveles superior e inferior de cada nutriente.

$y$  es la producción volumétrica de antraciclina para cada condición.

$\hat{y}$  es la respuesta pronosticada por el modelo matemático.

$b_0$  es el término independiente.

$b_1, b_2, y b_3$  son los coeficientes de regresión para los factores.

$x_1, x_2, y x_3$  son las unidades reales del experimento.

Después de haberse calculado el valor de  $b$ , tanto para los factores como para el término independiente, con unidades reales, se procedió a calcular los índices de producción que el modelo pronostica.

En la tabla 3.2.3.1. se dan los datos pronosticados ( $\hat{y}$ ) junto con la producción volumétrica real o experimental ( $y$ ), y los residuos o diferencias ( $d$ ) entre cada pronóstico y cada observación experimental.

Simultáneamente, se tabularon las sumas de cuadrados (SC) experimental, pronosticada, y residual que ayudarán a calcular el grado de explicación del modelo matemático.

Los residuos ( $d$ ) pueden graficarse en relación con  $y$  para definir la distribución de la muestra experimental.

En la figura 3.2.3.1. puede observarse que las desviaciones de los elementos muestrales indicaron una tendencia hacia una distribución normal (esquemática en el extremo derecho de la gráfica), lo cual garantizó la confiabilidad en el diseño experimental aplicado.

**Tabla 3.2.3.1. Pronóstico del modelo matemático para la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius*, y las sumas de cuadrados (SC) experimental, derivada del modelo, y residual.**

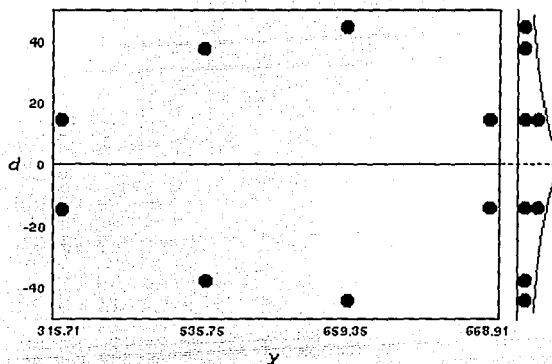
Condición	$\hat{y}$ (pronóstico)	$y$ (experimental)	$d = y - \hat{y}$ Residuo	$(y - \bar{y})^2$ SCexperimental	$(\hat{y} - \bar{y})^2$ SCmodelo	$(y - \hat{y})^2$ SCresidual
1	659.35	614.87	44.48	4891.60	13091.94	1978.47
2	535.75	573.35	-37.60	807.70	84.27	1413.76
3	315.71	330.17	-14.46	46121.86	52541.81	209.09
4	668.91	654.41	14.50	11985.87	15371.04	210.25
5	659.35	703.84	-44.49	25252.39	13091.94	1979.36
6	535.75	498.22	37.53	2181.82	84.27	1408.50
7	315.71	301.17	14.54	59418.94	52541.81	211.41
8	668.91	683.41	-14.50	19176.71	15371.04	210.25

$y$ =producción volumétrica real o experimental

$\hat{y}$ =producción pronosticada por el modelo

$\bar{y}$  =media de la producción volumétrica real o experimental global=544.93

$d$ =residuo o diferencia (error experimental)



**Figura 3.2.3.1.** Gráfica de residuos ( $d$ ) contra pronósticos del modelo matemático ( $\hat{y}$ ). A la derecha de esta gráfica se representa la distribución de las observaciones evaluadas; su normalidad indica que el diseño elegido para este estudio fue adecuadamente aplicado a la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius*, en el *mM1* formulado durante los ensayos de optimización previos a la aplicación del diseño experimental.

En la tabla 3.2.3.1. puede notarse la propiedad descubierta por Ronald Fisher [23] expresada como:

$$SC_{\text{experimental}} = SC_{\text{modelo}} + SC_{\text{residual}}$$

y que es la clave para determinar el grado de explicación (en %) que tiene el modelo matemático sobre el fenómeno observado, en este caso, sobre la producción de antraciclinas:

$$\% \text{ de explicación del modelo} = \frac{SC_{\text{modelo}}}{SC_{\text{experimental}}} \times 100$$

por lo tanto:

$$\% \text{ de explicación del modelo} = \frac{162178.12}{169836.89} \times 100 = 95.49 \%$$

Con estos resultados, se estableció que el modelo matemático propuesto explica adecuadamente, en términos de producción volumétrica de antraciclinas, el comportamiento de *Streptomyces peucetius* variante *caesi* en el *mMI*. Esto es así, porque se ha establecido que los modelos que explican por encima del 90 %, son estadísticamente perfectos, es decir, representan leyes naturales. El mínimo valor que puede aceptarse para que un modelo tenga una aplicación explicativa confiable sobre el fenómeno que se está investigando, es de 75 % [23].

Es importante hacer notar que la identidad:

$$SC_{\text{experimental}} = SC_{\text{modelo}} + SC_{\text{residual}}$$

para este diseño, no fue exacta; ya que para que la igualdad se cumpliera hizo falta una diferencia de 37.68 que constituye únicamente el 0.02 % de explicación sobre la producción de antraciclinas. Sin embargo, este hecho se explica como una consecuencia de la imperfección *natural* del modelo, la cual genera un porcentaje de error de pronóstico de 4.70 %, después de resolver la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de error de pronóstico} = \frac{SC_{\text{residual}}}{SC_{\text{modelo}}} \times 100$$

### 3.2.4. Diagrama cuboidal.

El modelo matemático que explica y pronostica la producción de antraciclina, en el *mm1*, por *Streptomyces peucetius* variante *caesi*, fue visualizado mediante un diagrama cuboidal (figura 3.2.4.1.). Dicho diagrama encierra el espacio experimental dentro del cual se desarrolló la investigación. Los niveles de producción fueron expresados como superficies de respuesta pronosticados por el modelo. Para la realización del diagrama fue necesario trazar la imagen de un cubo en perspectiva isométrica, de tal manera que pudieran dimensionarse adecuadamente los ejes coordenados cartesianos tridimensionales: abscisas ( $x$ ) para glucosa, ordenadas ( $y$ ) para  $\text{CaCO}_3$ , y cotas ( $z$ ) para levadura. Cada eje fue segmentado en unidades codificadas (parte interna del eje) y unidades reales (parte externa del eje). Para graficar las superficies de respuesta, se utilizaron las unidades codificadas, debido a la simplicidad de los cálculos. Con los pronósticos del modelo matemático, puede calcularse y dibujarse una infinidad de superficies de respuesta. Así, por ejemplo, si se desea trazar la superficie para  $710 \mu\text{g/ml}$  de antraciclina (valor elegido arbitrariamente), el término  $y$  del modelo predictor es substituido por  $710$ , al mismo tiempo que  $B$  (levadura de cerveza) es igualada a  $-1$  para explorar la base del diagrama cuboidal y encontrar los valores correspondientes a  $A$  (glucosa) y a  $C$  ( $\text{CaCO}_3$ ). El valor de  $B$  es incluido en el modelo normalizado, dando como resultado la siguiente ecuación:

$$57.42 A + 119.20 C = 112.43$$

Como se tienen dos incógnitas, es necesario otorgarle un valor codificado a cualquiera de ellas. De esta manera, si  $C$  es igualada a  $1$ , el punto resultante se encontrará sobre la arista formada por la base del diagrama y el plano frontal paralelo al eje  $x$  correspondiente a glucosa; y su valor será  $-0.118$ , el cual se ubicará sobre la escala codificada de dicho eje. Este punto se identificó como  $a$  en la figura 3.2.4.1. Posteriormente, manteniendo la igualdad  $B=-1$ , e igualando a  $A$  con  $1$ , se tiene que  $C=0.461$  que es el punto  $b$  en la figura 3.2.4.1. Finalmente, si  $C=1$  y  $A=1$ , entonces  $B=0.219$ , que equivale al punto  $c$  de la misma figura. Es así como se grafica la superficie de respuesta para  $y=710 \mu\text{g/ml}$ . Con estos mismos criterios puede trazarse la superficie de producción para cualquier respuesta pronosticada por el modelo. Es recomendable que tales superficies sean calculadas dentro de los límites experimentales fijados por los índices de producción volumétrica reales.

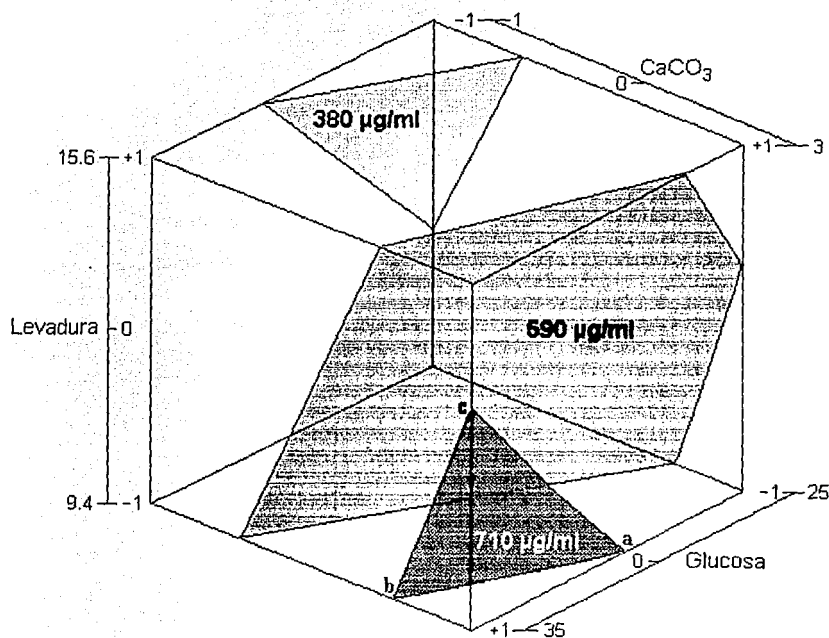
Aparte de la superficie de respuesta que explica la producción pronosticada de  $710 \mu\text{g/ml}$  de antraciclina, se graficaron dos más como ejemplo: la de  $590 \mu\text{g/ml}$  y la de  $380 \mu\text{g/ml}$  de antraciclina, ambas calculadas de la misma forma con la que se definió la anterior a ellas.

Nótese que las superficies que se obtienen con el modelo:

$$y = 544.93 + 57.42 A - 52.64 B + 119.20 C$$

son paralelas y prácticamente planas. Ello es un reflejo de la linealidad del mismo  $y$ , por lo tanto, de lo altamente pronosticable del proceso fermentativo bajo las condiciones establecidas hasta ahora. Es importante señalar que lo que se debe buscar en cualquier investigación es, justamente, establecer un modelo lineal para que los resultados sean acordes con la parcela de la realidad que se está estudiando. Como complemento a este aspecto, si las superficies de respuesta hubiesen sido curvas o plegadas, indicarían la existencia de interacciones entre

factores teniendo que modificar, por supuesto, el modelo matemático. Las interacciones dobles son las más frecuentes cuando se aplican adecuadamente los diseños experimentales, habiendo grandes posibilidades de linearizar los modelos que los explican. Sin embargo, cuando las interacciones son múltiples, las superficies de respuesta que se producen son del tipo de *hipérbola de doble manto* (también denominada "silla de montar"), y representan un comportamiento caótico con *zonas de catástrofe* localizadas en varios puntos imposibles de predecir. Cuando esto ocurre en una investigación, se debe, indudablemente, a un diseño experimental deficiente o a una mala interpretación de los resultados generados por experimentos anteriores.



**Figura 3.2.4.1.** Diagrama cuboidal que ilustra el comportamiento físico de la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *coesius* en el *mAl*. Además de la superficie que corresponde a 710  $\mu\text{g/ml}$ , se ilustran dos superficies más para visualizar la tendencia de producción pronosticada por el modelo matemático inferido de este estudio.

El diagrama cuboidal es una representación gráfica del proceso de fermentación, en donde es factible visualizar la correlación que guarda la progresión en aumento de las superficies de respuesta, en términos de producción, con la variación de la concentración de los factores glucosa, levadura y  $\text{CaCO}_3$ .

### 3.3. Consideraciones finales sobre el medio de producción optimizado.

#### 3.3.1. Costo del medio de producción optimizado.

El análisis del costo del medio de producción de antraciclinas fue sumamente importante, ya que desde los  $20.3 \pm 5.57 \mu\text{g/ml}$  de antraciclinas que se obtuvieron con el medio *inicial*, se avanzó extraordinariamente en su optimización hasta superar los  $700 \mu\text{g/ml}$ , reduciendo sensiblemente la concentración de los principales nutrientes.

En la tabla 3.3.1.1. se enlistan los precios por kilogramo de cada constituyente del medio de producción *inicial*, junto con el costo de los medios *inicial* y *mM1* por litro.

Tabla 3.3.1.1. Costos de cada uno de los nutrientes estudiados (N\$/kg), y de los medios *inicial* y *mM1* (optimizado).

Nutriente	Costo* (N\$/kg)	Costos de los medios de fermentación (N\$/l de medio)	
		Medio <i>inicial</i>	<i>mM1</i>
Glucosa	8.00	0.98	0.48
Levadura	18.00		
NaCl	5.00		
CaCO <sub>3</sub>	2.50		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	32.40		
MgSO <sub>4</sub>	4.10		
FeSO <sub>4</sub>	1.00		
ZnSO <sub>4</sub>	4.20		

\* Precios proporcionados por la Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V. durante el mes de octubre de 1994.

La reducción en el costo del medio de fermentación, considerando todo el trabajo realizado durante esta investigación, fue del 50 %, lo que en sí mismo, representó un avance notable.

Mediante la relación:

$$\text{Costo de antraciclinas en bruto} = \frac{\text{Costo del medio (N\$/l)}}{\text{Producción volumétrica (mg/l)}} \times 1000000 [=] \frac{\text{N\$}}{\text{kg de antraciclinas}}$$

se obtuvo el costo de las antraciclinas en bruto por kilogramo. Así, además de representar un ahorro sumamente importante para la producción de antraciclinas, los rendimientos se incrementan hasta varios miles por ciento en relación con el medio *inicial*.

Esta situación resulta evidente en la tabla 3.3.1.2. en donde se dan a conocer los precios por kilogramo que tendrían las antraciclinas en bruto, basadas exclusivamente en el costo del medio y en la producción volumétrica.

El precio exorbitante de antraciclinas calculado para el medio *inicial* era de esperarse debido a la relación del costo del medio y de la ínfima producción obtenida en el mismo.

El costo de las antraciclinas basado únicamente en el costo del medio de cultivo, es sólo una fracción de su costo real; deben considerarse otros criterios para definir el costo que tendrían en el mercado, lo cual escapa del ámbito de este trabajo.

**Tabla 3.3.1.2. Costo de las antraciclinas en bruto en los medios de fermentación evaluados durante esta investigación.**

Medio de producción	Costo del medio (N\$/l)	Producción volumétrica (mg/l)	Costo de antraciclinas (N\$/kg)
<i>inicial</i>	0.98	20.3	48276.00
<i>mM1</i>	0.48	780	615.00

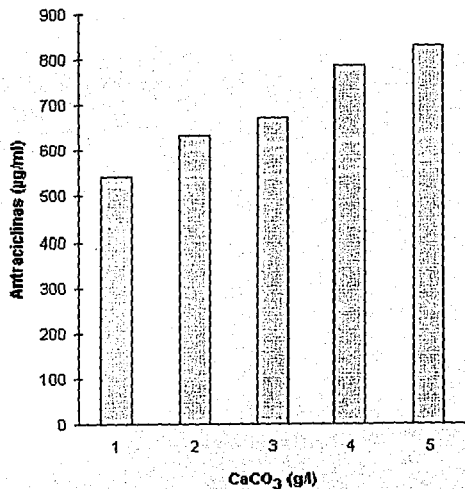
### 3.3.2. Trascendencia del pH sobre la producción de antraciclinas.

Aunque en esta investigación no se realizó un estudio formal sobre la variación del pH en el medio de fermentación, un ensayo colateral al diseño factorial fraccionado resaltó un aspecto importante que ya antes, y acorde con algunos trabajos referidos anteriormente, se había manifestado: un pH moderadamente alcalino favorece la producción de antraciclinas.

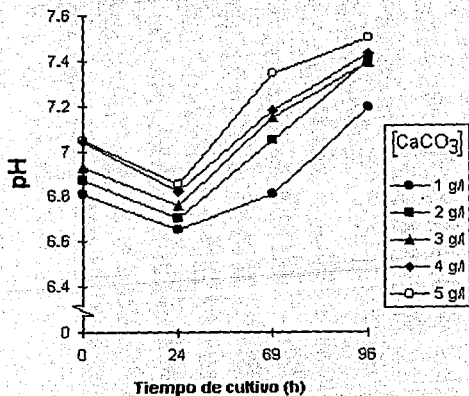
Dicho ensayo consistió en medir, únicamente, el efecto que tendría sobre la producción el  $\text{CaCO}_3$  en diferentes cantidades, manteniendo constantes las concentraciones de la glucosa (37.5 g/l) y de la levadura de cerveza (9.00 g/l), definidas empíricamente.

Las lecturas de producción fueron tomadas a las 96 horas de fermentación, y se evaluaron concentraciones de 1, 2, 3, 4, y 5 g/l de  $\text{CaCO}_3$ . Los resultados se muestran en las figuras 3.3.2.1. y 3.3.2.2.

Puede observarse claramente, que la producción de antraciclinas se incrementó conforme la concentración de  $\text{CaCO}_3$  también aumentó. Como consecuencia de la mayor concentración de  $\text{CaCO}_3$ , el pH inicial del medio (después de esterilizar) fue mayor cada vez (véase la figura 3.3.2.2.). El decremento inicial del pH en las primeras horas de fermentación, y su posterior aumento hasta valores de pH alcalinos, es característico de los cultivos de *Streptomyces penicetius* en medios sumergidos [18, 19]. El  $\text{CaCO}_3$  le confiere al medio de fermentación una adecuada capacidad amortiguadora. Cualitativamente se observó que la mayor parte del  $\text{CaCO}_3$  precipita al final del periodo de incubación. Con estos resultados puede deducirse la importancia que tiene el  $\text{CaCO}_3$  como agente amortiguador del pH, más que por su utilización por el microorganismo para la producción de antraciclinas. Aunque con altas concentraciones de  $\text{CaCO}_3$  los títulos de antraciclinas se vieron incrementados, se reservó su elección como uno de los mejores medios debido a que el exceso de la sal interfirió con los procesos de extracción, cuantificación, y purificación de las muestras, lo cual incrementaría su valor con base en estos procedimientos y no en el medio de cultivo.



**Figura 3.3.2.1.** Producción volumétrica de antracilinas variando únicamente la concentración de CaCO<sub>3</sub>. Las concentraciones de glucosa y levadura se mantuvieron constantes: 37.5 y 9.00 g/l, respectivamente.



**Figura 3.3.2.2.** Cinéticas de pH producidas al evaluar diferentes concentraciones de CaCO<sub>3</sub>.



### 3.3.3. Cuantificación de doxorubicina.

El medio *inicial* del que se partió en esta investigación, es básicamente el mismo que ha sido reportado por Federico Arcamone y otros investigadores para la producción de doxorubicina por *Streptomyces peucetius* variante *caesius* [2, 3, 50]. Sin embargo, aunque la producción de antraciclinas se incrementó considerablemente, los títulos de doxorubicina no superaron las expectativas que se habían formulado en el sentido de que su incremento sería concomitante con el del grueso de los compuestos antracilínicos sintetizados por el microorganismo.

Se pensó que durante el proceso de extracción y purificación ocurrieran mermas del compuesto, por lo que se ensayaron modificaciones en el método de extracción, y se evaluaron diferentes sistemas de elución para cromatografías; pero los procedimientos que reditaron los mejores resultados fueron los que ya han sido propuestos anteriormente, y que se detallan en la *Parte II* de esta tesis (extracción con la mezcla  $\text{CH}_3\text{COCH}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ , 4:1 v/v; y cromatografía con el sistema  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ , 100:20:2). Al cuantificar las muestras sobre las placas cromatográficas con el digitalizador *TLC Scanner II* (CAMAG<sup>SM</sup>), se encontró que la producción máxima de doxorubicina durante toda la investigación fue apenas de 1.58  $\mu\text{g/ml}$  en el medio *inicial*, y 8.30  $\mu\text{g/ml}$  en el *mMI*. Esta última concentración se encuentra dentro de los límites productivos reportados formalmente hasta ahora (5-15  $\mu\text{g/ml}$ ) [50]. Aunque no se logró incrementar la producción de doxorubicina más allá de los datos hasta ahora publicados, es importante observar que bajo las condiciones de trabajo establecidas durante esta investigación, se obtuvo un progreso en la producción de dicho fármaco en más de cinco veces en relación con el medio *inicial*.

## CONCLUSIONES

El objetivo principal de esta tesis fue optimizar un medio de cultivo para la producción de antraciclinas por *Streptomyces peucetius* variante *caesius* en matraces, el cual fue concretado, definiendo la influencia de los factores estudiados sobre la producción, mediante un modelo matemático generado por un diseño experimental factorial fraccionado.

Los diferentes experimentos que se realizaron durante esta investigación, demostraron la importancia de diversos factores fisicoquímicos, principalmente de los nutrientes del medio de cultivo, sobre la producción de antraciclinas, y el diseño experimental definió el comportamiento del fenómeno concretándolo en una explicación matemática.

Con la finalidad de favorecer la transferencia de masa durante la fermentación, se implementó el uso de *perlas de vidrio* dentro de los matraces con deflectores, donde se llevaron a cabo los cultivos líquidos.

Simultáneamente, el proceso de optimización del medio de cultivo, se inició variando la concentración de la levadura de cerveza, obteniéndose títulos de antraciclinas claramente superiores a los obtenidos en el medio *inicial*. Durante esta etapa, la producción se incrementó desde  $20.3 \pm 5.57$  hasta  $140 \pm 14.6$   $\mu\text{g/ml}$  de antraciclinas, a las 96 horas de fermentación.

De esta manera, y coincidiendo con la mayoría de los trabajos publicados al respecto, la fuente de nitrógeno constituida por la levadura de cerveza tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento del microorganismo y sobre la producción de antraciclinas, en el medio *inicial*. Al parecer, altas concentraciones de levadura de cerveza dificultan la transferencia de masa, de ahí que fuera necesario reducir la concentración de levadura hasta un 50 %.

Desde este momento, se evaluaron uno a uno los factores nutricionales que formaron parte de la formulación del medio *inicial*, estableciendo las diferencias entre las condiciones ensayadas en función de elementos y conceptos estadísticos.

Así, se encontró que el  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  inhibió la producción de los antibióticos, por lo que es recomendable eliminarlo de la formulación del medio.

Aunque la glucosa no representó ningún obstáculo para que el microorganismo se desarrollara y produjera antraciclinas, la reducción en su concentración hasta del 50 % favoreció la producción, incrementándola casi al doble. Aún se desconoce el mecanismo preciso por el cual la glucosa regula la producción de antraciclinas en *Streptomyces peucetius* y sus mutantes.

El  $\text{CaCO}_3$  fue un factor sumamente importante puesto que permitió mantener el pH del medio dentro de un rango ligeramente ácido en las primeras etapas de la investigación, y alcalizándose posteriormente, contrarrestando así la acidificación inducida por el metabolismo de la glucosa.

Los compuestos  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ , y  $\text{ZnSO}_4$  no mostraron influencias significativas sobre la producción de antraciclinas, por lo que su eliminación de la formulación del medio fue factible. Aunque esto ya se había observado durante los experimentos previos al diseño, era necesario cuantificar sus efectos y sus posibles interacciones en una combinación ortogonal.

El diseño factorial fraccionado es uno de los más empleados para la evaluación y optimización de procesos en general, resultando ser, muchas veces, el camino más corto y seguro hacia la comprensión y optimización de éstos. Por este motivo, se decidió utilizarlo para valorar con confiabilidad estadística los efectos que los componentes del medio de cultivo tienen

sobre la producción de antraciclinas, bajo un esquema ortogonal, centrandó su análisis en métodos estadísticos de carácter predictivo.

Los resultados de este análisis llevaron a la conclusión de que la glucosa y el  $\text{CaCO}_3$  ejercen un efecto positivo sobre la producción de antraciclinas, mientras que el efecto de la levadura de cerveza es negativo.

La aditividad de los efectos nutricionales sobre la producción obedeció a un comportamiento lineal, por lo que la evaluación uno a uno de los factores durante los experimentos previos a la aplicación del diseño adquirió su justificación estratégica y metodológica.

La visualización del espacio experimental a través de un diagrama cuboidal con sus superficies de respuesta, permitió conferirle su esencia física y predictiva, dentro del dominio experimental, a los coeficientes de regresión calculados durante el análisis del diseño.

En la última etapa de la investigación, se realizó un análisis de costos del medio mejorado (*mMI*) contra el medio *inicial*, lo cual dio como resultado una reducción del costo del medio de cultivo en un 50 %, mientras que la producción de antraciclinas se elevó hasta más de 38 veces sobre la producción generada en el medio *inicial*. De  $20.3 \pm 5.57 \mu\text{g/ml}$  de antraciclinas obtenidas en el medio *inicial*, se llegaron a producir hasta  $780 \pm 27 \mu\text{g/ml}$  en el *mMI*.

Quedó establecido que el procedimiento de optimización empleado en esta investigación fue adecuado para elevar la producción de antraciclinas, lo cual demuestra que es probable desarrollar un proceso específico de optimización para la producción de doxorubicina, siempre que sea plenamente identificada la fase crítica de su síntesis; que bien pudiera encontrarse en los procesos analíticos de extracción y purificación, y no precisamente en la fermentación. No obstante, es aconsejable que en estudios y proyectos sobre antraciclinas, posteriores al presente, se enfatice en la evaluación de la transferencia de masa, especialmente de oxígeno, y en el pH del medio. Estos trabajos podrían llevarse a cabo variando velocidades de agitación, modificando las relaciones del volumen de trabajo y volumen nominal, incluyendo en el medio sistemas amortiguadores de pH estables e inertes y, sobre todo, el uso de fermentadores en lugar de matraces.

Por lo que respecta a proyectos de optimización, es casi imprescindible la aplicación de diseños experimentales desde el inicio de cualquier investigación. Su correcta y oportuna aplicación, reduce substancialmente tiempos y movimientos, además de generar resultados sumamente confiables y pronosticables.

## REFERENCIAS

- 1) AHMED, Z. U., Shapiro, S. and Vining, L. C., "Excretion of  $\alpha$ -keto acids by strains of *Streptomyces venezuelae*", *Canadian Journal of Microbiology* **30**, 1014 (1984).
- 2) ARCAMONE, F., Doxorubicin: Anticancer antibiotics, Academic Press, the United States of America 1981.
- 3) ARCAMONE, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C. and Spalla, C., "Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceitius* var. *caesioides*", *Biotechnology and Bioengineering* **11**, 1101 (1969).
- 4) ASZALOS, A. and Berdy, J. "Cytotoxic and antitumor compounds from fermentations", *Annual Reports on Fermentation Processes* **2**, 305 (1978).
- 5) AUBEL-SADRON, G. and Londos-Gagliardi, D., "Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review", *Biochimie* **66**, 333 (1984).
- 6) BAJPAI, A. C., Mustoe, L. R. and Walker, D., Specialist techniques in engineering mathematics, John Wiley & Sons, Great Britain 1980.
- 7) BOX, G. E. P. and Hunter, J. S., "The  $2^{k-p}$  fractional factorial designs. Part I", *Technometrics* **3**, 311 (1961).
- 8) BOX, G. E. P. and Hunter, J. S., "The  $2^{k-p}$  fractional factorial designs. Part II", *Technometrics* **3**, 449 (1961).
- 9) BOX, G. E. P., Hunter, W. G. and Hunter, J. S., Statistics for experimenters, John Wiley & Sons, the United States of America 1978.
- 10) BROCK, T. D., Smith, D. W. y Madigan, M. T., Microbiologia, 4ª edic., Ed. Prentice Hall, México 1987.
- 11) BUDAVARI, S., O'Neil, M. J., Smith, A. and Heckelman, P. E., The Merck index, 11th ed., Merck & Co., Inc., the United States of America 1989.

- 12) CARTER, S. K., "Adriamycin-A review", *Journal of the National Cancer Institute* **55**, 1265 (1975).
- 13) COCHRAN, W. G. y Cox, G. M., Diseños experimentales, 2ª edic., Ed. Trillas, México 1990.
- 14) CONNORS, N. C., Bartel, P. L. and Strohl, W. R., "Biosynthesis of anthracyclines: carminomycin 4-O-methyltransferase, the terminal enzymic step in the formation of daunomycin", *Journal of General Microbiology* **136**, 1895 (1990).
- 15) CONNORS, N. C., Bartel, P. L. and Strohl, W. R., "Biosynthesis of anthracyclines: enzymic conversion of aklanononic acid to aklavinone and  $\epsilon$ -rhodomycinone by anthracycline-producing streptomycetes", *Journal of General Microbiology* **136**, 1887 (1990).
- 16) CORCORAN, J. W., Biosynthesis, vol. IV, Springer-Verlag, Germany 1981.
- 17) CRESPI-PERELLINO, N., Grein, A., Merli, S., Minghetti, A. and Spalla, C., "Biosynthetic relationships among daunorubicin, doxorubicin and 13-dihydro-daunorubicin in *Streptomyces peucetius*", *Experientia* **38**, 1455 (1982).
- 18) DEKLEVA, M. L. and Strohl, W. R., "Glucose-stimulated acidogenesis by *Streptomyces peucetius*", *Canadian Journal of Microbiology* **33**, 1129 (1987).
- 19) DEKLEVA, M. L., Titus, J. A. and Strohl, W. R., "Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium", *Canadian Journal of Microbiology* **31**, 287 (1985).
- 20) DOULL, J. L. and Vining, L. C., "Physiology of antibiotic production in actinomycetes and some underlying control mechanisms", *Biotechnology Advances* **8**, 141 (1990).
- 21) DRAPER, N. R. and Smith, H., Applied regression analysis, 2ª ed., John Wiley & Sons, the United States of America 1981.
- 22) ECKARDT, K. and Wagner, Ch., "Biosynthesis of anthracyclonones", *Journal of Basic Microbiology* **28**, 137 (1988).
- 23) FABILA, G., Diseño y análisis de experimentos industriales, (en impresión), Ed. Universidad Iberoamericana, México 1994.
- 24) FLOREY, Klaus, Analytical profiles of drug substances, vol. IX, Academic Press, the United States of America 1980.

- 25) FUJIWARA, A. and Hoshino, T., "Anthracycline antibiotics", *CRC Critical Reviews in Biotechnology* **3**, 133 (1986).
- 26) GALE, E., Candliffe, E., Reynolds, P., Richmond, M. and Waring, M., The molecular basis of antibiotic action, 2nd ed., John Wiley & Sons, Great Britain 1981.
- 27) GLASBY, J. S., Encyclopaedia of antibiotics, 2nd ed., John Wiley & Sons, Great Britain 1979.
- 28) GRÁFE, U., Dornberger, K., Wagner, C. and Eckardt, K., "Advances in bioconversion of anthracycline antibiotics", *Biotechnology Advances* **7**, 215 (1989).
- 29) GREIN, A., "Antitumor anthracyclines produced by *Streptomyces peucetius*", *Advances in Applied Microbiology* **32**, 203 (1987).
- 30) GREIN, A., "Development of biosynthetic anthracyclines of the daunorubicin group by genetic and fermentation studies", *Process Biochemistry*, **october/ november**, 34 (1981).
- 31) HEATH, O. V. S., Investigation by experiment, 5th ed., Edward Arnold, Great Britain 1979.
- 32) HERSHBERGER, C., Queener, S. and Hegeman, G., Genetics and molecular biology of industrial microorganisms, 1st ed., American Society for Microbiology, the United States of America 1989.
- 33) HOPTON, J. and Hill, E., Industrial microbiological testing, 1st ed., Blackwell Scientific Publications, Great Britain, 1987.
- 34) KRUMPHANZL, V., Sikyta, B. and Vaněk, Z., Overproduction of microbial products, 1st ed., Academic Press, Great Britain 1982.
- 35) McGUIRE, J. C., Hamilton, B. K. and White, R. J., "Approaches to development of the daunorubicin fermentation", *Process Biochemistry*, **december**, 2 (1979).
- 36) McGUIRE, J. C., Thomas, M. C., Stroshanf, R. M., Hamilton, B. K. and White, R. J., "Biosynthesis of daunorubicin glycosides: role of  $\epsilon$ -rhodomycinone", *Antimicrobial Agents in Chemotherapy* **18**, 454 (1980).
- 37) MONTGOMERY, D. C., Design and analysis of experiments, 2nd ed., John Wiley & Sons, the United States of America 1984.

- 38) NAKASHIMA, H., Yamamoto, N., Inouye, Y. and Nakamura, S., "Inhibition by doxorubicin of human immuno-deficiency virus (HIV) infection and replication *in vitro*", *The Journal of Antibiotic* **40**, 396 (1987).
- 39) PANDEY, R. C., Kalita, C. C., White, R. J. and Toussaint, M. W., "Process development in the purification of daunorubicin from fermentation broths", *Process Biochemistry*, **december**, 6 (1979).
- 40) PENCO, S., "Antitumour anthracyclines: new developments", *Process Biochemistry*, **june/july**, 12 (1980).
- 41) PRATT, W. and Ruddon, R., *The anticancer drugs*, Oxford University Press, the United States of America 1979.
- 42) ROSENSTEIN, E., *Diccionario de especialidades farmacéuticas*, 35<sup>a</sup> edic., PLM, México 1989.
- 43) ROSENSTEIN, E., *Diccionario de especialidades farmacéuticas*, 39<sup>a</sup> edic., PLM, México 1993.
- 44) SAVAL, S. B., *Desarrollo de un proceso fermentativo para la producción de estreptomycin*, UNAM, México 1991.
- 45) SUMNER, J. B. (1944). "A method for the colorimetric determination of phosphorus", *Science* **100**, 413 (1944).
- 46) SUROWITZ, K. G. and Pfister, R. M., "Glucose metabolism and pyruvate excretion by *Streptomyces alboniger*", *Canadian Journal of Microbiology* **31**, 702 (1985).
- 47) SUZUKI, F., Trenbeath, S., Gleim, R. D. and Sih, Ch. J., "Total synthesis of adriamycinone. Regiospecific synthesis of anthracyclines via base-catalyzed cyclizations", *Journal of the American Chemical Society* **100**, 2272 (1978).
- 48) The United States Pharmacopeia XXII: The National Formulary XVII, 22<sup>th</sup> review, United States Pharmacopeial Convention, Inc., the United States of America 1990.
- 49) TRITTON, T. R. and Yee, G., "The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells", *Science* **217**, 248 (1982).
- 50) VANDAMME, E. J., *Biotechnology of industrial antibiotics*, vol. XXII, Marcel Dekker, Inc., the United States of America 1984.

51) WANG, J. J., Chervinsky, D. S. and Rosen, J., "A comparative biochemical study of adriamycin (AM) and daunorubicin (DNR)", *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **12**, 77 (1971).

52) WEATHERBURN, M. W., "Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia", *Analytical Chemistry* **39**, 971 (1967).

53) ZWEIG, G. and Sherma, J., *Handbook of chromatography*, vol. I, CRC Press, the United States of America 1981.

54) ZWEIG, G. and Sherma, J., *Handbook of chromatography*, vol. III, CRC Press, the United States of America 1989.