

**CONDICIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE UN ANTIBIÓTICO DE USO
VETERINARIO EMPLEANDO HIPERCUBO LATINO**

**(CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF AN ANTIBIOTIC FOR VETERINARY
USE USING HIPERCUBO LATINO)**

Zuleika Manzabet, Eudomar Natera, Llelysmar Crespo.

Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales “Ezequiel Zamora” UNELLEZ. Programa
Ciencias del Agro y del Mar. San Carlos-Estado Cojedes, Venezuela.

manzabet@hotmail.com / nater_181@hotmail.com / llely.crespo@gmail.com.

Recibido: 30-08-2019/ Aceptado: 24-10-2019

RESUMEN

El cambio climático, la aparición de diferentes patologías, la propagación de enfermedades conocidas a distintas zonas geográficas, los nuevos conocimientos sobre la convergencia de la salud pública y la sanidad animal, son solo algunos de los problemas que debe enfrentar el mundo actual, con el empleo de fármacos seguros, eficaces, de gran calidad que tiendan a controlar y prevenir enfermedades, además de garantizar el bienestar de los animales. Con esta motivación, a través de la presente investigación se pretendió explorar las condiciones para la producción de un antibiótico de uso veterinario empleado hipercubo latino. Para ello se seleccionó y acondicionó el sustrato (lechada de maíz) empleado en el proceso de producción del *Penicillium chrysogenum*, se diseñó el arreglo de tratamientos óptimos hipercubo latino escalables para el proceso producción del antibiótico tipo ungüento. Asimismo, se estudió vía simulación las condiciones operativas para su proceso de producción, resultando que la unión de 6,77 g de *Penicillium chrysogenum* y 2,30 g de etilenglicol permiten obtener un antibiótico de uso veterinario con un POR de 52,78 mV, densidad de 0,79 g/ml y un pH alrededor de 6,57. De lo anterior se desprende que heterogeneidad de la formulación, la densidad elevada y la consistencia semisólida es la propia de los ungüentos y garantiza tanto las propiedades hidratantes, oclusivas y congestivas, como la capacidad de ejercer una acción local y formar una capa impermeable sobre la piel del animal que dificulta la evaporación del agua, permitiendo así que su concentración sea más alta en la superficie.

Palabras clave: *Penicillium chrysogenum*, ungüento, hipercubo latino.

SUMMARY

Climate change, the appearance of different pathologies, the spread of known diseases to different geographical areas, new knowledge about the convergence of public health and animal health, are just some of the problems that the world must face today, with the use of safe, effective, high quality drugs that tend to control and prevent diseases, in addition to ensuring the welfare of animals. With this motivation, through the present investigation it was tried to explore the conditions for the production of an antibiotic of veterinary use used hipercubo latino. For this purpose, the substrate (corn slurry) used in the *Penicillium chrysogenum* production process was selected and conditioned, and the arrangement of scalable hypercube optima treatments for the production process of the ointment-type antibiotic was designed. Likewise, the operating conditions for its production process were studied via simulation, resulting in the union of 6.77 g of *Penicillium chrysogenum* and 2.30 g of ethylene glycol to obtain an antibiotic for veterinary use with a POR of 52.78 mV, density of 0.79 g / ml and a pH around 6.57. From the above it follows that heterogeneity of the formulation, high density and semisolid consistency is that of ointments and guarantees both moisturizing, occlusive and congestive properties, as well as the ability to exert a local action and form an impermeable layer on the skin of the animal that hinders the evaporation of water, thus allowing its concentration to be higher on the surface.

Keywords: *Penicillium chrysogenum*, ointment, latin hypercube.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la industria farmacéutica en Venezuela se encuentra pasando por una grave crisis, debido en gran medida a la carencias de insumos para lograr producir medicamentos tan esenciales como los antibióticos, los cuales son compuestos químicos producidos por microorganismos y que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos no benéficos (Andón, 2010), en pocas palabras su función se basa en el control y erradicación de microorganismos patógenos sensibles. Este uso terapéutico de los antibióticos presenta una toxicidad selectiva, es por ello que resulta dañino para el agente patógeno y no afectan o son relativamente inocuos para los huéspedes infectados (Fernández, 2014), asimismo deben seleccionarse estudiándose las diferencia entre la bioquímica del agente infectivo y la del hospedador, por ejemplo la penicilina inhibe la síntesis de la pared celular (Gaitán y Espinal, 2009; Armijos *et al.*, 2017).

En este propósito los medicamentos de uso veterinario en especial los antibióticos existen desde tiempos inmemoriales, pero nunca antes habían sido tan necesarios para controlar enfermedades infecciosas y proteger el bienestar de los animales (OIE, 2015).

En relación con este último, antibióticos como la penicilina proveniente de cepas de *Penicillium chrysogenum* han constituido la medida terapéutica de mayor éxito en la disminución de los porcentajes de mortalidad en seres humanos y animales (Núñez, 2016).

Sobre la base de las consideraciones anteriores a través de la presente investigación se pretende explorar las condiciones para la producción de un antibiótico tipo ungüento de uso veterinario, como una alternativa útil frente a agentes sintéticos en infecciones cutáneas, empleando para ello un diseño de experimentos hipercubo latino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se encuentra enmarcada según Hurtado (2012), dentro del tipo exploratoria, debido a que el propósito de la misma es explorar, sondear y descubrir posibilidades para la producción de un antibiótico de uso veterinario, tipo ungüento que permita tratar efectivamente las enfermedades infecciosas que pueden sufrir las diversas especies veterinarias incluidas perros, gatos, conejos, erizos aves, entre otros. Hecha la observación anterior la población estuvo compuesta por 400 g (*Penicilina tipo G*, glicol, azufre y petrolato) representativos de los 10 tratamientos realizados, asimismo la muestra constó de 40 g. En ese mismo sentido la investigación se desarrollo mediante las siguientes fases:

Fase I: Obtención del microorganismo *Penicillium chrysogenum*. Esta fase de la investigación se inició con el proceso de reproducción del microorganismo, para ello se ubicó el tipo de sustrato más apropiado, dando como resultado que la lechada de maíz posee los nutrientes necesarios para el desarrollo del *Penicillium chrysogenum*, por ser rico en vitaminas y minerales. En ese mismo sentido se procedió al acondicionamiento del sustrato, para ello se separaron los granos de maíz y se procedió a la molienda. Una vez obtenida la masa, con ayuda de un liencillo se exprimó hasta alcanzar una solución clarificada, posteriormente se le realizaron análisis químicos y microbiológicos como pH,

solidos totales (°Brix) y coliformes totales y fecales, empleando lo establecido en las normas venezolanas COVENIN. Luego se lleva al auto clave para la esterilización a 121°C por 15 min a 15 lbf/pulg². Seguidamente se procedió al acondicionamiento del microorganismo en el biorreactor con la adición de complejo vitamínico, lactosa 2-3% compuesto inorgánico, se empleó como precursor benceno, 2ml de fenol, 2ml de ácido acético a fin de garantizar la reproducción del microorganismo como se muestra en la figura 1. En este propósito, se procedió a la toma de las muestras, las cuales se realizaron en intervalos de tiempo de 1 hora, desde la hora de inicio (h₀) hasta la hora final (h₂₄), con diluciones por triplicado y siembra en placas para verificar la presencia del microorganismo.

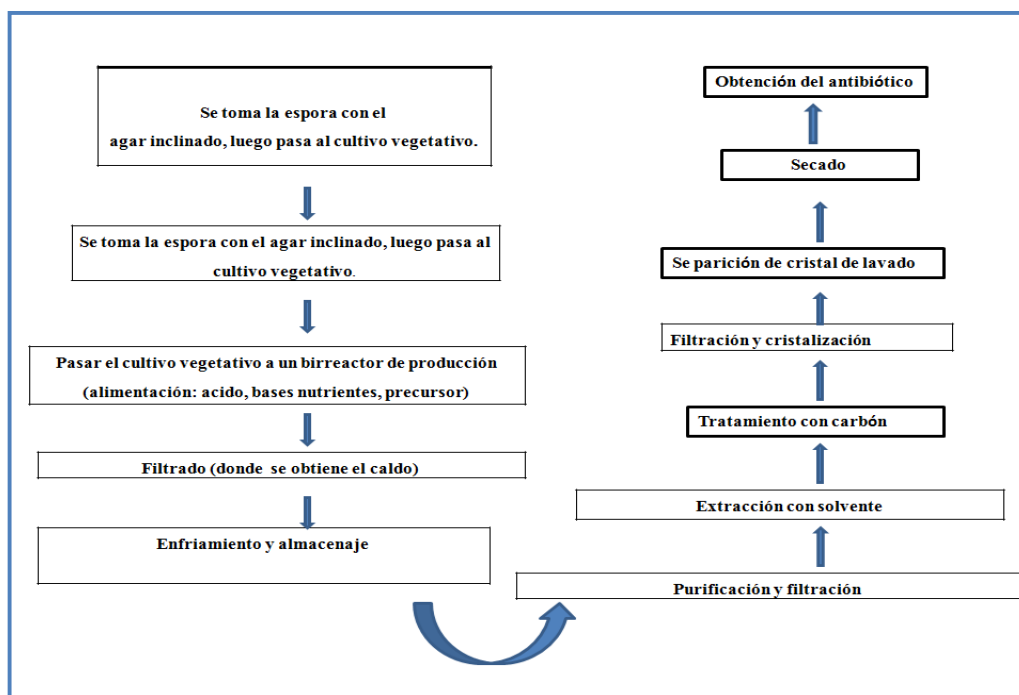


Figura 1. Proceso de reproducción del microorganismo *Penicillium chrysogenum* (H)

Fase II: Diseño del arreglo de tratamientos óptimos hipercubo latino escalables para el proceso producción del antibiótico tipo ungüento En esta etapa de la investigación se empleó el diseño método hipercubo latino (Latin Hyhipercube) debido a que maximiza la distancia mínima entre los puntos del diseño (igual espaciamento de los niveles de cada

factor). Hecha la observación anterior se procedió a realizar las pruebas preliminares a fin de obtener los mínimos y máximos de los factores experimentales X_1 : cantidad *Penicilina tipo G* con un rango de 5g a 10 g y X_2 : cantidad de glicol con un nivel de 1g a 3 g, a fin de medir como respuestas Y_1 : pH, Y_2 : Potencial oxido reducción y Y_3 : Densidad.

Fase III: Estudio vía simulación de las condiciones operativas para el proceso de producción del antibiótico. En esta etapa de la investigación se estableció el modelo ajustado al proceso experimental (meta modelo) resultando múltiples MLCI1erO+Itrip; los cuales requieren hacerle mantenimiento en el tiempo, para ajustar con variancias y ruidos nuevos, a fin de modificar los modelos ajustados y obtener el modelo simplificado o también llamado sustituto. Para ello, se empleó como técnica la simulación con redes neuronales, herramientas que presentan gran capacidad predictiva atreves del software SAS JMP 8 (2014).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el cuadro 1, se observa que la lechada obtenida es completamente aséptica, lo que garantiza que el sustrato se encuentra en forma pura. Asimismo la cantidad de azucars disueltos pueden ser considerada buena, lo que permite dar inicio al complejo proceso de nutrición del *Penicillium chrysogenum* y favorecer su crecimiento microbiano, el cual se ubicó por el orden de 10^9 Ufc en un tiempo de 24 horas.

Cuadro 1. Análisis químico y microbiológico de la lechada de maíz

Parámetros	Resultado	Método de ensayo
pH [+]	6,5	COVENIN:1315-17
Solidos totales (°Brix),	7	COVENIN 1031-81
Coliformes totales y fecales	0	COVENIN 1104:1996

En el cuadro 2, se muestra la matriz “D” de diseño de tratamientos, con dos repeticiones y, las respectivas respuestas tecnológicas medidas, para cada tratamiento;

seguidamente se presenta un análisis preliminar de bondad de ajuste de los datos, a modelos lineales aditivos, cuadráticos; una vez mostrada la robustez de los modelos se realiza un análisis SCREENING, en la búsqueda de diagnosticar que términos del modelo lineal aditivo de alto orden son los más importante en explicar cada respuesta. Finalizando con la modelación definitiva y optimización operativa del proceso.

Cuadro 2. Matriz de diseño de tratamientos y respuestas tecnológicas medidas al antibiótico de uso veterinario

Tratamiento	X1 Penicilina tipo G (g)	X2 glicol (g)	Azufre (g)	Petrolato (g)	total en gr	Y1 pH [+]	Y2 POR (mV)	Y3 Dens (g/ml)
1	5	1,67	1	32,33	40	7,75	39,5	0,78
2	8,89	3	1	27,11	40	6,89	4,6	0,90
3	6,11	1	1	31,89	40	6,85	2,5	0,78
4	6,67	1,89	1	30,44	40	6,4	58,6	0,67
5	7,22	2,78	1	29	40	6,7	46,8	0,78
6	9,44	1,44	1	28,12	40	6,47	2,42	0,67
7	8,33	2,11	1	28,56	40	6,41	29,5	0,90
8	10	2,33	1	26,67	40	6,67	15,6	0,78
9	7,78	1,22	1	30	40	7,8	10,6	0,90
10	5,56	2,56	1	30,88	40	6,18	40,6	0,70

En lo siguiente, se muestra, una visualización de la bondad de ajuste de los datos a modelos lineales aditivos cuadráticos, del tipo:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{i \neq j}^j \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \varepsilon$$

El modelo para 02 (cuatro) factores experimentales, tendrá la siguiente estructura:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon_i$$

Una vez ajustado los modelos (uno para cada respuesta), se comprobó sus supuestos básicos de los errores de predicción: $\varepsilon_i \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

1. Normalidad: los datos obtenidos en cada nivel del factor se ajustaron razonablemente a una distribución Normal de Gauss.

2. Homocedasticidad: la variabilidad de los datos en cada nivel del factor es similar (contraste de igualdad de varianzas).
3. Linealidad: los residuos (diferencia de los datos a su media, en cada nivel del factor) se distribuyen alrededor del cero (gráfico de residuos).
4. Independencia: las observaciones se realizan de forma independiente unas de otras

En ese mismo sentido la modelación de las variables medidas, se ajustaron con mínimos cuadrados ordinarios matriciales, usando el programa SAS JMP 8, el módulo de regresión de superficie de respuesta y; para la optimización operativa el módulo de perfiles de respuesta y de deseabilidad, junto con el simulador del programa SAS JMP 8.

Se ajustaron dos modelos (uno para cada respuesta), formando el meta modelo o modelo de simulación de calidad del antibiótico de uso veterinario tipo ungüento.

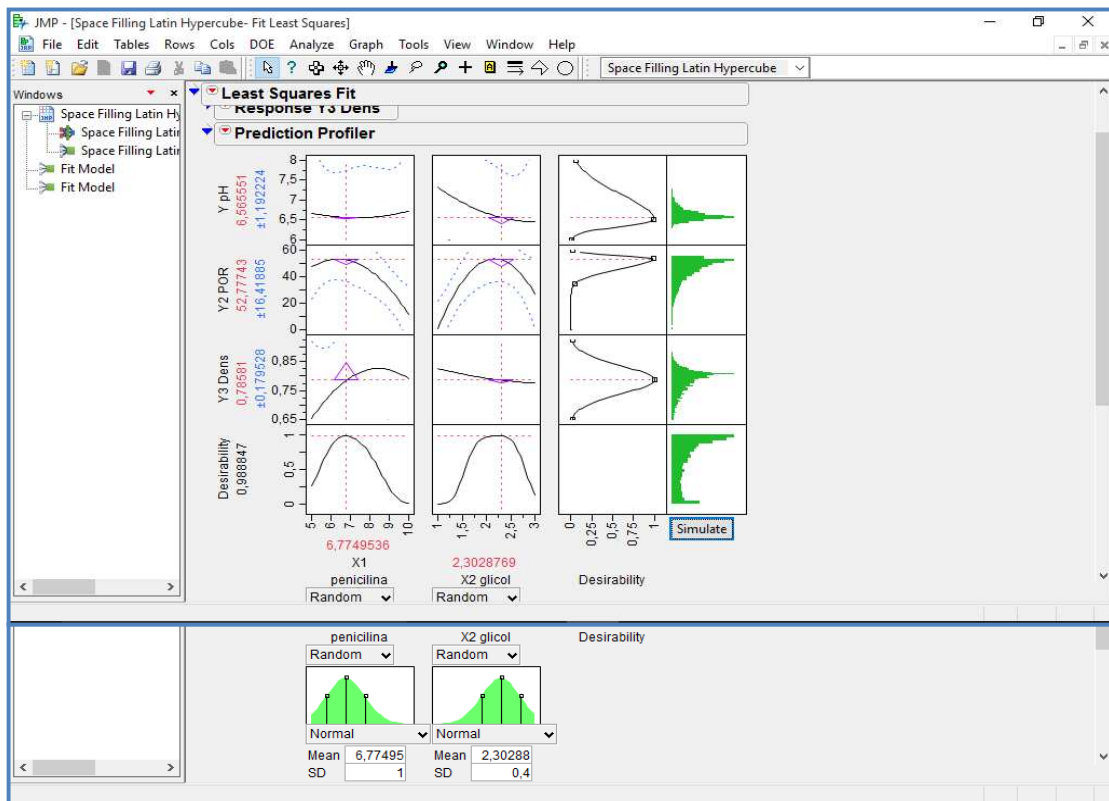


Figura 2. Condiciones de calidad alcanzadas para maximizar la producción de un antibiótico de uso veterinario tipo ungüento

En la figura 2, se muestran las condiciones alcanzadas para maximizar la producción del antibiótico, dichas condiciones experimentales son de X_1 : 6,77 g; X_2 : 2,30 g, para la obtención del ungüento a base de *Penicillium chrysogenum* de uso veterinario con un POR de 52,78 mV, una densidad de 0,79 g/ml y un pH alrededor de 6,57.

Con referencia a lo anterior, se observa que el antibiótico obtenido es muy heterogéneo, con una densidad elevada y una consistencia semisólida, propia de los ungüentos, lo que garantiza tanto las propiedades hidratantes, oclusivas y congestivas, como la capacidad de ejercer una acción local y formar una capa impermeable sobre la piel del animal que dificulte la evaporación del agua, permitiendo así que su concentración sea más alta en la superficie y va disminuyendo en profundidad, a fin de que pueda ubicarse entre los antibióticos más apropiados en procesos de epidermis y dermis superficial.

Como una forma de contrastar los resultados, se procesaron los datos con una red neuronal previamente entrenada (figura 3), reflejando un r-cuadrado con un valor por encima del 97,15 %, lo que indica una excelente bondad de ajuste del modelo empleado y le permite a las variables (pH, POR y Densidad) explicar el proceso de exploración de las condiciones para la producción de un antibiótico de uso veterinario.

Asimismo, con la finalidad de evaluar la efectividad (trascendencia de los objetivos planteados) del antibiótico tipo ungüento desarrollado, se procedió a su aplicación en tres caninos de la comunidad (UNELLEZ) que presentaban laceraciones en los costados y orejas, además se probó en dos porcinos de la Finca Cuatro Puertas con lesiones cutáneas en orejas, logrando demostrar que en ambos casos el antibiótico presenta alta capacidad de penetración en la piel y amplio espectro, que se ve reflejado en el cambio de color de las lesiones que inicialmente estaban enrojecidas y al segundo día de aplicación se tornaron blanquecinas, dando inicio al proceso de cicatrización, el cual se prolongó hasta el cuarto día, por lo que se puede inferir que el empleo de este tratamiento cutáneo es capaz de actuar positivamente en procesos infecciosos de la piel en animales.

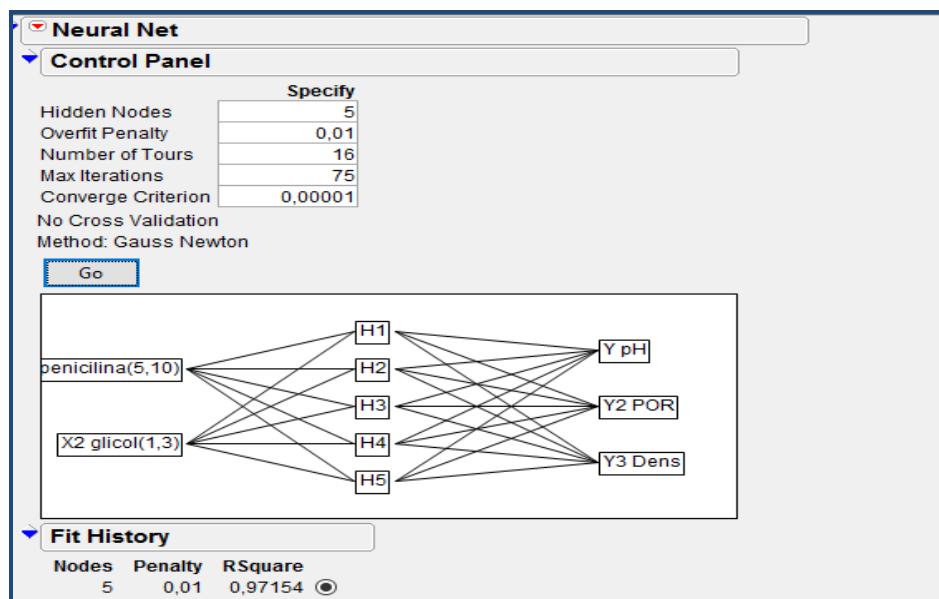


Figura 3. Red neuronal artificial, condiciones de entrenamiento y bondad de ajuste

CONCLUSIONES

Luego de los resultados obtenidos se han establecido las siguientes conclusiones:

- La lechada de maíz demostró ser un sustrato rico en micro y macro nutrientes al poseer proteínas, vitaminas (A, C, E), minerales (calcio, hierro, magnesio, entre otros) y fibra, necesarios para el desarrollo de un microorganismo altamente productor de penicilina como el *Penicillium chrysogenum*, que actúa de manera benéfica atacando enfermedades infecciosas en animales como perros, gatos, cerdos, entre otros.
- Los arreglos de tratamientos hipercubo latino utilizados, permitieron ajustar modelos lineales aditivos de alto orden, con excelente bondad de ajuste, para el proceso de exploración de las condiciones de producción de un antibiótico de uso veterinario, que demostró poseer buenos caracteres organolépticos gracias a la incorporación de sustancias como el petrolato, que es empleada como base de emulsión y es capaz de absorber cantidades considerables de agua para obtener en el antibiótico la consistencia de ungüento.

- Los modelos ajustados y la metodología de optimización vía simulación, permitieron pronosticar condiciones operativas óptimas para el proceso de producción de un antibiótico tipo ungüento de uso veterinario, al obtener un compuesto que contiene 6,77 g de *Penicillium chrysogenum*; 2,30 g de glicol; 40 g de petrolato y 1 g de azufre, que al ser aplicado en animales demostró poseer una buena tolerabilidad, baja incidencia de alergia, mínima toxicidad, alta capacidad de penetración en la piel, que se ve reflejado en el pH alcanzado cuyo valor se ubicó por el orden de 6,57 con una densidad aproximada de 0,79 g/ml además de presentar un bajo costo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Andón, A (2010). Antibióticos de uso veterinario y su relación con la seguridad alimentaria y salud pública. Tesis Doctoral. Madrid– España. 135 p.
- Armijos, B.; Herrera, L.; Santos, J.; Medina, A.; Segura, M. Resistencia de la bacteria *Escherichia coli* por la beta-lactamasas. *Revista UNEMI*, Vol.10, N°. 24. Pp: 65-73.
- Fernández, J. (2014). Microalgal Biotechnology. [Artículo en línea]. [Consulta 09/03/2018]. Disponible en <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema1---generalidades/1-5-modos-de-cultivo.html>
- Gaitán, C.; Espinal, M. (2009). Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, Vol. 26, N° 29. Pp: 239–246. Disponible en <https://doi.org/10.4067/S0716-10182009000400006>
- Hurtado, J. (2012). Metodología de la investigación. Guía para la comprensión Holística de la ciencia. Cuarta edición. Ediciones Quirón. 1327 p.
- Núñez, M. Estudio de la Susceptibilidad Antibiótica en el Área VII de la Región de Murcia (2011-2014). Tesis de Maestría. Región de Murcia, España. 186 p.
- OIE. (2015). ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. Resistencia a los antibióticos. [Artículo en línea]. [Consulta 17/02/2018]. Disponible en https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Fact_sheets/ANTIBIO_ES.pdf
- SAS JMP 8. (2014). Software SAS Institute Inc. JMP business unit SAS.JMP: Jonhn’s macintosh program.