

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

Ingeniería de biorreactores para mejorar la biosíntesis de violaceína a partir de

Pseudoalteromonas luteoviolacea

INGE-2890

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Químico

Presentado por:

Josue Paul Acaro Romero

Nelson Andrés Parra Guevara

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

El presente proyecto lo dedico en primer lugar a Dios, por ser luz guía en mi vida, mi fuente de disciplina, sabiduría y fortaleza para culminar esta etapa. A mis padres, Homero Acaro y Carmen Romero, a quienes admiro con mucha devoción y les debo todo lo que soy, su constante esfuerzo, amor y palabras de aliento ha sido el motor en cada paso que he dado. A mi hermana, Stefany Acaro, por impulsarme a siempre querer destacar y ser mejor persona. Este logro es tan suyo como mío, su sacrificio, paciencia y entrega han hecho posible la culminación de esta meta. Ustedes son mi orgullo, mi inspiración y mi mayor bendición.

Josue Paul Acaro Romero

El presente proyecto lo dedico a Dios por darme la sabiduría y fuerza para poder avanzar a lo largo de la carrera, a mis padres Julio Parra y María Guevara por ser mi constante fuente de aliento y apoyo, a mis hermanas Nicoles Parra y Astrid Parra por su ayuda y ánimos, a mi Abuelita Inés Gavilanes por sus constantes oraciones y todos aquellos familiares y amigos que estuvieron ahí para ayudarme, a mis fieles compañeros Sammi y Pelusa quienes me hacían compañía en mis noches de estudio.

Nelson Andrés Parra Guevara

Agradecimientos

Agradezco la culminación de este proyecto a nuestro tutor, Joan Vera, por darnos las facilidades y herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto. Al Biotecnólogo, Iván Gonzabay, por estar presto siempre a cualquier inquietud y brindarnos su apoyo en los laboratorios del CENAIM. A nuestro cliente, Cristóbal Domínguez, por aportarnos conocimiento sobre este proyecto y brindarnos disponibilidad en los laboratorios. A mis amigos, con quienes compartí risas, preocupaciones y desafíos a lo largo de este trayecto universitario, por haber hecho de la carrera más llevadera y menos estresante. Y finalmente quiero agradecer a Miriam, por acompañarme en este reto, sus palabras de apoyo y sobre todo su cariño me impulsaron a seguir adelante.

Josue Paul Acaro Romero

Agradezco la culminación de este proyecto a nuestro tutor Joan Vera por brindarnos de su tiempo para guiarnos durante todo el proceso. Al Biotecnólogo, Iván Gonzabay, por toda la paciencia y la alegría que mostraba al momento de impartir sus conocimientos. Expreso mi sincero agradecimiento al Máster Cristóbal Domínguez por su destacada gestión en los laboratorios y por la paciencia con la que comparte su conocimiento. A todos los pasantes del CENAIM los cuales no dudaron en brindarnos su apoyo y palabras de ánimo durante este proceso y a mis amigos quienes siempre estuvieron pendientes del proceso y prestos a brindar ayuda.

Nelson Andrés Parra Guevara

Declaración Expresa

Nosotros Josue Paul Acaro Romero y Nelson Andrés Parra Guevara acordamos y reconocemos que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique los autores que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 19 de mayo del 2025.



Josue Paul Acaro
Romero



Nelson Andrés Parra
Guevara

Evaluadores

María Verónica Ordoñez Pazmiño

Profesor de Materia

Joan Ramón Vera Villalobos

Tutor de proyecto

Resumen

El cáncer constituye una de las principales causas de muerte al nivel mundial. Ante esta problemática se han investigado tratamientos alternativos como biopigmentos, entre ellos la violaceína que ha demostrado en ensayos con animales poseer características antitumorales, sin embargo, su limitada producción ha frenado su avance a fases clínicas en humanos. Este proyecto busca optimizar parámetros claves que permitan obtener mayor concentración de violaceína, reduciendo significativamente los costos de materia prima. Para el desarrollo del proyecto, se elaboró un protocolo de descontaminación de albúmina de huevo usando luz UV, que garantizó la selectividad de la bacteria *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, posteriormente se realizó la preparación de medios de cultivos donde se desarrollaron ensayos en Kitasatos de 500 ml variando temperaturas, pH, agitación y aireación, finalizando con un ensayo en un Kitasato de 2000 ml. Se cuantificó la cantidad de proteína en la albúmina, evidenciando que una exposición total de 15 minutos a luz UV degrada 7.51% de proteína. Además, se determinó que, a 27°C, pH de 6.5, aireación baja y nula agitación se consigue mayor concentración de violaceína. Estos hallazgos posibilitan iniciar una producción de violaceína de manera controlada y sostenible, permitiendo adentrarse a un nuevo sector industrial.

Palabras Clave: *Escalamiento de proceso, albúmina de huevo, parámetros clave, descontaminación de sustrato*

Abstract

*Cancer is one of the leading causes of death worldwide. In response to this problem, alternative treatments such as biopigments have been investigated, including violacein, which has demonstrated antitumor properties in animal trials. However, its limited production has hindered its advancement to human clinical trials. This project seeks to optimize key parameters that allow for higher concentrations of violacein, significantly reducing raw material costs. For the development of the project, an egg albumin decontamination protocol was developed using UV light, which guaranteed selectivity for the *Pseudoalteromonas luteoviolacea* bacteria. Culture media were then prepared, where assays were performed in 500 ml Kitasatos, varying temperatures, pH, agitation, and aeration, concluding with an assay in a 2000 ml Kitasato. The amount of protein in the albumin was quantified, demonstrating that a total exposure of 15 minutes to UV light degrades 7.51% of the protein. Furthermore, it was determined that a higher violacein concentration is achieved at 27°C, pH 6.5, low aeration, and no agitation. These findings make it possible to initiate controlled and sustainable violacein production, allowing for entry into a new industrial sector.*

Keywords: *Process escalation, egg albumin, key parameters, substrate decontamination*

Índice general

Evaluadores.....	VII
Resumen	I
<i>Abstract</i>	II
Índice general	III
Abreviaturas	VI
Simbología	VII
Índice de figuras	VIII
Índice de tablas	VIII
Capítulo 1	1
1.1 Introducción.....	2
1.2 Descripción del Problema.....	3
1.3 Justificación del Problema.....	4
1.4 Objetivos	5
1.4.1 Objetivo general	5
1.4.2 Objetivos específicos.....	5
1.5 Marco teórico.....	6
1.5.1 Tratamientos convencionales del cáncer: Costos y limitaciones.	6
1.5.2 Biopigmentos como agentes anticancerígenos alternativos.	7
1.5.3 Violaceína: Un biopigmento con propiedades anticancerígenas destacables.	8
1.5.4 <i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> como fuente de violaceína.	8
1.5.5 Medios de cultivo	9
1.5.6 Albúmina de huevo como sustrato	9
Capítulo 2	10
2. Metodología	11
2.1 Descripción del proceso	11

2.2	Producción y protocolo de descontaminación de albúmina de huevo	11
2.2.1	Preparación de albúmina	11
2.2.2	Protocolo de descontaminación de albúmina	12
2.3	Cuantificación de proteína	13
2.4	Preparación de medios de cultivos	13
2.5	Viabilización de la bacteria a inocular	14
2.6	Determinación de temperatura óptima	15
2.7	Determinación de pH óptimo	16
2.8	Determinación de aireación óptima	16
2.9	Recolección de datos	17
2.10	Cuantificación de violaceína	17
2.11	Escalamiento del proceso de producción	19
Capítulo 3	20
3.	Resultados y análisis	21
3.1	Introducción al análisis de resultados	21
3.2	Preparación y descontaminación de albúmina	21
3.3	Evaluación a diferentes Temperaturas	23
3.4	Evaluación a diferente aireación	25
3.5	Evaluación de agitación	28
3.6	Evaluación diferente pH en un volumen de 300 ml	29
3.7	Escalado de 300 ml a 1.6 L	31
3.8	Simulación de escalado a 20 L en Aspen Batch Process Development	33
3.9	Análisis económico	34
Capítulo 4	37
4.1	Conclusiones y recomendaciones	38
4.1.1	Conclusiones	38

4.1.2	Recomendaciones.....	39
	Referencias	41
	Anexos	47

Abreviaturas

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARN Ácido ribonucleico

FAO Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

FDA Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos)

INEC Instituto Nacional de Estadística y Censos

OMS Organización Mundial de la Salud

ROS Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxígeno)

RPM Revoluciones por minuto

UV Ultravioleta

Simbología

\$	Dólar estadounidense
°C	Grados Celsius
g	Gramos
Kg	Kilogramo
kW	Kilovatio
kWh	Kilovatio hora
L	Litro
mg	Miligramo
ml	Mililitro
uL	Microlitro
nm	Nanómetro
N	Normalidad
pH	Potencial de hidrógeno
%	Porcentaje
W	Vatio

Índice de figuras

Figura 2.1 <i>Irradiación con luz UV a albúmina de huevo</i>	13
Figura 3.1 <i>Formación de biopelícula en ensayos a 35°C</i>	24
Figura 3.2 <i>Concentración de violaceína al día 5 en ensayos de temperatura</i>	24
Figura 3.3 <i>Desarrollo de producción de violaceína durante 5 días en ensayos de temperatura</i> .	25
Figura 3.4 <i>Desarrollo de producción de violaceína durante 5 días en ensayos de aireación</i>	26
Figura 3.5 <i>Gráfico de barras de Tukey de concentración de violaceína</i>	27
Figura 3.6 <i>Ensayos de agitación (Baja, alta y nula)</i>	29
Figura 3.7 <i>Gráfico de barra de concentración de violaceína en ensayos de pH</i>	30
Figura 3.8 <i>Desarrollo de producción de violaceína en ensayos de pH durante 5 días</i>	31
Figura 3.9 <i>Gráfico de barras de la violaceína al 5to día en ensayos de Escalado a 2 L</i>	32
Figura 3.10 <i>Contaminación de reactor 2 de escalado a 1.6 L</i>	33

Índice de tablas

Tabla 3.1 <i>Concentración promedio de proteína en albúmina de la primera preparación</i>	22
Tabla 3.2 <i>Concentración promedio de proteína en albúmina de la segunda preparación</i>	22
Tabla 3.3 <i>Concentración promedio de proteína en albúmina de la tercera preparación</i>	22
Tabla 3.4 <i>Concentración promedio de violaceína al día 5 en ensayos de temperatura</i>	24
Tabla 3.5 <i>Concentración promedio de violaceína al día 5</i>	27
Tabla 3.6 <i>Concentración de violaceína al 5to día en ensayos de agitación</i>	28
Tabla 3.7 <i>Concentración promedio de violaceína al día 5 en ensayos de pH</i>	30
Tabla 3.8 <i>Concentración promedio de violaceína al día 5 en ensayos de escalado</i>	33
Tabla 3.9 <i>Costo de materiales</i>	35
Tabla 3.10 <i>Costos de producción de simulación de planta piloto a 20 L</i>	36

Capítulo 1

1.1 Introducción

El cáncer constituye una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2022 se reportaron aproximadamente 20 millones de nuevos casos y 9.7 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad. En Ecuador, el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) señala que el cáncer es la segunda causa de muerte, con más de 14.000 fallecimientos anuales, siendo los tipos más comunes el cáncer de mama, próstata, estómago y cuello uterino (INEC, 2022).

Ante esta problemática, la búsqueda de compuestos bioactivos con potencial terapéutico ha generado un interés creciente en el ámbito científico. Bajo este contexto, los biopigmentos microbianos han emergido como una alternativa, no solo por su origen natural, sino también por sus propiedades farmacológicas. La violaceína, un pigmento violeta derivado del triptófano ha demostrado actividades antibacterianas, antiparasitarias, antioxidantes y, especialmente, antitumorales, lo que la posiciona como un candidato potencial en el desarrollo de fármacos antineoplásicos (Durán et al., 2007; Rodrigues et al., 2013).

Este biopigmento es producido por bacterias como *Chromobacterium violaceum* y *Janthinobacterium lividum*. Sin embargo, se ha evidenciado que otras especies como *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, una bacteria marina, son capaces de producir violaceína, esta cepa ofrece ventajas por su adaptación a condiciones salinas y su potencial biotecnológico (Alker et al., 2020).

A pesar de su potencial terapéutico, la producción de violaceína enfrenta limitaciones relacionadas a bajos rendimientos, altos costos de medios de cultivo y sobre todo dificultades para su escalamiento. Por ello es necesario optimizar los parámetros de cultivo y buscar fuentes de nutrientes accesibles y sostenibles, se planteó la producción de violaceína mediante la variación

de parámetros de cultivo como temperatura, aireación, agitación y pH, utilizando albúmina de huevo como sustrato y principal fuente de proteína.

La albúmina es abundante en aminoácidos esenciales como el triptófano, el cual precursor clave en la biosíntesis de violaceína, por lo que representa una alternativa para medios de cultivo no convencionales. Además, esta estrategia se alinea con los principios de la bioeconomía circular y la producción sustentable de biofármacos (McMenamy, R, & Oncley, 1958).

En la presente investigación se buscó aportar conocimiento técnico y experimental sobre la influencia de parámetros fisicoquímicos en la síntesis de violaceína a partir de *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, con el fin de generar datos aplicables al desarrollo de procesos más eficientes y factibles para su eventual aplicación en terapias oncológicas.

1.2 Descripción del Problema

Los tratamientos convencionales contra el cáncer más conocidos en la actualidad son las quimioterapias y radioterapias, los cuales varían sus valores dependiendo de la etapa en la que se encuentra el paciente. Adicional a los elevados costos asociados a terapias, se ha evidenciado que los tratamientos convencionales presentan una especificidad limitada al momento de eliminar células, es decir que elimina a su paso tanto células malignas como benignas (Pöhlmann et al., 2024; Zafar et al., 2025). Generando efectos secundarios como pérdida de cabello, náuseas y fatiga e incluso se ha llegado a presentar casos en los que las células cancerígenas tienden a generar resistencia a los tratamientos (Pucci et al., 2019).

En el presente estudio, la principal fuente de obtención de violaceína corresponde a la bacteria *Pseudoalteromonas luteoviolacea*. Sin embargo, la bacteria carece de estudios que evalúen parámetros óptimos de producción a escala piloto o industrial, lo que representa una limitante significativa en el estudio de su biosíntesis.

La producción de violaceína depende en gran parte del sustrato. El triptófano es un aminoácido esencial para la producción de violaceína debido a que es el precursor en su ruta de biosíntesis (Gwon et al., 2021). Diversos productos comerciales cuentan con este aminoácido en su composición, sin embargo, sus costos son elevados, partiendo de \$200 a \$700 los 500 gramos de acuerdo con la información proporcionada en la página Sigma Aldrich (2025).

Es por ello que se reúnen constantes esfuerzos en investigaciones con la *Pseudoalteromonas luteoviolacea* y la producción del pigmento, con el fin de buscar fuentes alternas de sustrato, determinar condiciones óptimas para su crecimiento y los mejores protocolos para asegurar su inocuidad y escalamiento a planta piloto. Dar este paso de laboratorio a escala piloto supondría un gran avance en la tecnología e innovación en el Ecuador, trabajando con un producto clave en el desarrollo de nuevas estrategias anticáncer e incluso la violaceína tiene aplicaciones no solamente en el ámbito de la salud humana, sino que también es muy usada en el campo de los insecticidas y en el área cosmetológica. De esta forma se abren las puertas a varios sectores en la industria ecuatoriana.

1.3 Justificación del Problema

Esta investigación surgió en necesidad de optimizar las condiciones de producción de violaceína, la cual ha demostrado que puede ser usada como un método alternativo a los tratamientos convencionales de cáncer como la quimioterapia o la radioterapia, de los que, a pesar de presentar efectividad, también presentan efectos secundarios adversos. Además de determinar parámetros clave para el desarrollo de la bacteria, la optimización del proceso de producción también se buscó encontrar una fuente de proteína que sustituya a sustratos comerciales con costos elevados. En el presente estudio se hizo uso de la albúmina de huevo como sustituto del sustrato comercial.

Con lo mencionado anteriormente, existe la posibilidad de impulsar este proyecto en la industria ecuatoriana una vez que se determinen los parámetros óptimos para una producción sostenible. Los elementos involucrados en este proceso presentan la ventaja en cuanto a su disponibilidad, el medio líquido es el agua de mar tratada proveniente de las playas del país; el sustrato es la albúmina de huevo preparada en los laboratorios siguiendo un protocolo de descontaminación garantizando su efectividad como sustrato; y, el extracto de levadura en futuras investigaciones se podría buscar una fuente alterna y menos costosa. Esto supondría un gran avance para industria biotecnológica en el país y de la región, aportando gran valor a la comunidad científica. De esta forma se busca cumplir con los Objetivos de Desarrollo Sostenible, garantizando un uso responsable de los recursos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Optimizar el proceso de biosíntesis de violaceína determinando parámetros claves en su escalamiento a nivel de laboratorio para presentarlo como propuesta de fármaco antineoplásico.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Diseñar un protocolo de descontaminación de albúmina de huevo, garantizando su selectividad respecto a la *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, a través de ensayos microbiológicos de control y evaluación de su impacto en la producción de violaceína.
2. Determinar las condiciones de temperatura, agitación, aireación y pH en un biorreactor para la maximización del rendimiento de la producción de violaceína, mediante experimentos por lotes.
3. Simular el proceso de biosíntesis de violaceína usando Aspen Batch Process Developer, para el escalamiento a planta piloto de un biorreactor y su análisis tecno económico.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Tratamientos convencionales del cáncer: Costos y limitaciones.

En la actualidad, la quimioterapia y la radioterapia son los tratamientos más comunes para eliminar y reducir las células cancerosas en personas, estos procedimientos fueron aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) en el año de 1949 y 1896 respectivamente. La quimioterapia consisten en el uso de agentes citotóxicos que suprimen el crecimiento de células cancerosas, los mecanismos de acción más comunes son la ruptura de ADN y la intervención en la síntesis de ADN y ARN(Tilsed et al., 2022), la limitación de este tratamiento es la falta de especificidad al momento de eliminar las células pues no solo ataca células cancerosas sino también células sanas de rápida división produciéndose como efecto secundario una disbiosis, la cual es una alteración en la microbiota reduciendo bacterias beneficiosas como el lactobacillus y aumentando el riesgo de proliferación de patógenos oportunistas (Deleemans et al., 2019). También se produce eritropoiesis, la cual es la destrucción de eritrocitos sanos y defectuosos afectando la liberación de hemoglobina lo que conlleva a la anemia (Bryer & Henry, 2018) .

Se presenta otra limitante debido al desarrollo de mecanismos de resistencia a fármacos quimioterapéuticos de las células cancerosas, como la resistencia por células madre cancerosa, las cuales pueden regenerar el tumor tras la quimioterapia (Tilsed et al., 2022). La radioterapia consiste en exponer a las células cancerosas a altas dosis de radiación con la finalidad de afectar el ADN de las células, entre su principal función esta la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la ruptura de cromosomas afectando el metabolismo celular y produciendo muerte celular (Tominaga et al., 2004).

A pesar de que en la actualidad se cuenta con métodos de mayor precisión como la irradiación con ayuda de resonancias magnéticas o tomografía computarizada, el daño que se genera a las células sanas circundantes se mantiene debido a que el ADN y estructura de las mismas

es sensible a la radiación, generando una desventaja en cuanto al tiempo de espera entre cada sesión puesto que las células cancerosas pueden desarrollar mecanismos moleculares como antioxidantes mitocondriales que protegen a las células malignas contra el daño generado por ROS(Chen et al., 2021; Fisher & Goswami, 2008). La formación de ROS se ve afectada por la hipoxia tumoral la cual no permite la estabilización de radicales libres y por tanto se descomponen o estabilizan antes de causar daños al ADN(Akhunzianov et al., 2025).

La quimioterapia en países europeos el costo oscila entre \$5000 a \$13000 contando con un seguro médico mientras que sin un seguro el valor oscila entre los \$13000 y \$24000 (Berger et al., 1998). La radioterapia puede oscilar entre valores de \$5500 a los \$111901 si no se cuenta con un seguro médico (Deschuymer et al., 2020), a esto se le añade el tiempo de espera que sufre el paciente debido a la alta demanda.

1.5.2 Biopigmentos como agentes anticancerígenos alternativos.

Dada la problemática planteada por los tratamientos convencionales se presentan a los biopigmentos como estrategia alternativa en tratamientos oncológicos, siendo la prodigiosina uno de los precursores en este campo. Los primeros análisis fueron presentados en el año 2001, este artículo detalla como el pigmento activa mecanismos de apoptosis de células cancerosas mostrando una gran selectividad al momento de inducir estrés oxidativo (Montaner & Pérez-Tomás, 2001). En base a esto, se tomaron en cuenta características con los que deben contar los biopigmentos, primero se someterán a estudios inicialmente in vitro, y posteriormente el análisis en modelos con animales.

En la actualidad, los biopigmentos que más destacan en cuanto al cumplimiento de los criterios de selectividad son: curcumina, prodigiosina y violaceína. Sin embargo, ninguno de estos compuestos ha logrado la aprobación para su uso clínico, dado que las normativas establecidas por la FAO, impone lineamientos estrictos y obligatorios como conocimiento de la farmacocinética,

estudios de toxicidad a corto, medio y largo plazo (U.S. Food and Drug Administration, 2018), además de la purificación y escalamiento de proceso de producción.

1.5.3 Violaceína: Un biopigmento con propiedades anticancerígenas destacables.

La violaceína es un pigmento color violeta derivado del L-Triptófano, se obtiene a partir de reacciones enzimáticas definidas, cuya ruta biosintética está dada por los genes vioA, vioB, vioC, vioD, vioE (Füller et al., 2016) . Este biopigmento presenta una alta efectividad anticancerígena en ensayos in vitro, lo que ha dado paso al estudio de su eficacia en modelos animales. Existen estudios que demuestran la eficacia de la violaceína en cuanto a la eliminación de células malignas y tumores resistentes a los tratamientos convencionales, debido a que demuestran una gran actividad en ambientes hipóxicos reduciendo así la metástasis, además generan un mayor estrés oxidativo al aumentar las especies oxidativas de oxígeno, lo que conlleva a la apoptosis de células cancerosas (de Carvalho et al., 2006). Las pruebas consideran el uso de forma directa inyectando el compuesto en la zona intraperitoneal o indirecta empleando bacterias productoras dirigidas al tumor (Hashimi et al., 2015).

1.5.4 *Pseudoalteromonas luteoviolacea* como fuente de violaceína.

Actualmente, existen varios microorganismos productores de violaceína, entre las más comunes se encuentran las *Duganella violaceinigra*, *Collimonas*, *Pseudoalteromonas luteoviolacea*. Estas bacterias presentan la ventaja de ser no patógenas en seres humanos por lo tanto se facilita el establecimiento de los protocolos de bioseguridad al momento de planificar el escalamiento a nivel industrial (Choi et al., 2015)

Las *Pseudoalteromonas* destacan por ser bacterias altamente adaptables, mayormente encontradas en organismos marinos, que poseen la característica de formar biopelículas y su aislamiento se da comúnmente mediante resiembra sucesiva, adicionalmente se pueden incubar fácilmente a temperaturas entre 25 y 30 grados Celsius en medios sólidos o líquidos (Soliev et al.,

2011). Se ha identificado que existen cepas de estas bacterias que tienen la capacidad de formar biopigmentos lo que ha generado interés por sus potenciales farmacológicos.

1.5.5 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son nutrientes, ya sean líquidos o sólidos, que permiten la multiplicación de microorganismos. En el caso de las *Pseudoalteromonas luteoviolacea* es común aislarlas empleando un medio sólido constituido por agar marino dada la alta salinidad de éste, posteriormente, se inocula la bacteria en medio líquido procurando el aumento de su concentración, proporcionando fuentes de carbono, nitrógeno, sales y oligoelementos que activan o reprimen las rutas metabólicas para la obtención de un compuesto (Timmermans et al., 2019).

1.5.6 Albúmina de huevo como sustrato

La albúmina de huevo es usada en microbiología como un suplemento proteico en medios de cultivos buscando favorecer el crecimiento bacteriano, debido a su composición alta en aminoácidos esenciales (Atlas, 2010). Tiene la capacidad de estabilizar enzimas en medios sensibles o de difícil crecimiento. Los péptidos bioactivos derivados de la albúmina contribuyen a la estabilidad del cultivo, mejorando la eficiencia en estudios microbiológicos (Obianwuna et al., 2022). En cuanto a su composición, la albúmina de huevo está constituida por gran cantidad de aminoácidos esenciales, de los cuales el triptófano tiene una composición entre 1.25% y 1.5% del total de aminoácidos (Attia et al., 2020). Estudios han demostrado que el triptófano permite la formación de biofilms y producción de compuestos antimicrobianos, los cuales son aspectos relevantes para bacterias marinas (Nahariah et al., 2015).

Capítulo 2

2. Metodología

2.1 Descripción del proceso

El presente proyecto busca optimizar las condiciones de producción de violaceína a partir de *Pseudoalteromonas luteoviolacea* con la finalidad del escalamiento a laboratorio empleando biorreactores de 2 litros.

2.2 Producción y protocolo de descontaminación de albúmina de huevo

Para la obtención de albúmina de huevo es necesario hacer uso únicamente de las claras, pues es en este líquido viscoso donde se concentra el triptófano requerido para la preparación del medio de cultivo. A continuación, se describe el paso a paso de la obtención de albúmina y adicional a ello se presenta un protocolo de descontaminación de esta.

2.2.1 Preparación de albúmina

Todo el proceso descrito debe realizarse en un ambiente inocuo y estéril exceptuando el secado en la estufa.

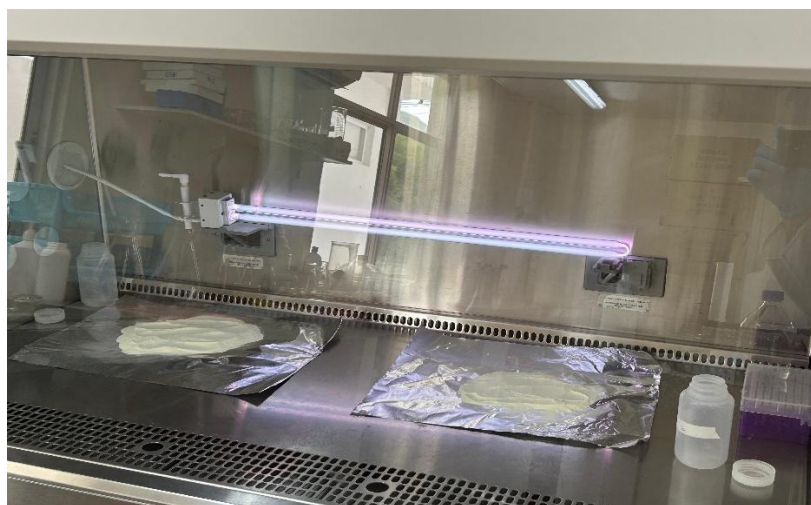
- Se descontaminó el área de trabajo. Se irradió luz UV a mandiles y uso obligatorio de guantes y mascarillas.
- Se vertió únicamente las claras de huevos en un recipiente autoclavado para una rápida extracción.
- Se usó jeringas estériles o autoclavadas para extracción las claras de huevos del recipiente. Una vez que se obtuvo la cantidad de clara de huevo en la jeringa, se adaptó en la punta un filtro 0.5 μm .
- En las cajas Petri autoclavadas se colocó las claras de huevo hasta que se formó una capa que cubra toda la superficie, procurando que no sea ni muy delgada, ni muy gruesa.

- Se calentó previamente la estufa a 200°C durante 2 horas para la eliminación de posibles bacterias que estén presentes en el equipo. Esta metodología está respaldada en el estudio de Alshammari, F. & Hussein, H. (2022). Donde se menciona que el calentamiento seco a temperaturas de 150°C y 200°C se eliminan patógenos en papel, lo que puede extrapolarse a la desinfección de equipos.
- Después de pasadas las 2 horas se dejó enfriar a 45°C.
- Una vez que se mantuvo estable la temperatura a 45°C se colocó las cajas Petri con la clara de huevo en la estufa y se dejó secar durante un periodo de 8 a 12 horas.
- Con la albúmina ya seca, se transportaron las bandejas al área de trabajo.
- Se rasparon las cajas Petri con espátulas autoclavadas o esterilizadas para remover la albúmina seca y su posterior maceración, la cual se realizó con un mortero desinfectado.

2.2.2 Protocolo de descontaminación de albúmina

- Una vez pulverizada la albúmina se procedió a colocarla en una lámina de aluminio lo suficientemente grande como para que quepa toda la albúmina y se la esparció en la superficie.
- Se irradió luz UV durante 5 minutos y se dejó descansar la albúmina por 2 minutos. Este proceso se repitió 3 veces. Entre cada descanso se procuró redistribuir la albúmina de tal forma que la irradiación UV permita descontaminar gran mayoría de la proteína y no únicamente en la superficie.
- La albúmina descontaminada se trasvasó en un frasco previamente autoclavado y pesado.

Figura 2.1 *Irradiación con luz UV a albúmina de huevo*



2.3 Cuantificación de proteína

La luz UV a pesar de ser efectiva para descontaminar la albúmina de huevo, también degrada sus proteínas, es por ello que surge la necesidad de una cuantificación proteica. Para determinar si la cantidad de proteína degradada por irradiación UV es significativa, se hizo uso de la fórmula de Warburg-Christian establecida en Creative Biomart (2025) por lo que se procedió a realizar la lectura de una solución proteica (la cual tiene una concentración de 1 mg de la albúmina preparada por ml agua Milli Q) a 280 y 260 nm en el Varioskan Thermo Fisher Scientific. Este procedimiento se realizó antes y después de la irradiación con la finalidad de obtener el porcentaje de proteína degradada.

2.4 Preparación de medios de cultivos

Los medios de cultivo donde se desarrollan las bacterias están constituidos por nutrientes suficientes para que el crecimiento bacteriano se vea favorecido. En la presente investigación, la principal fuente de nutrientes del medio es la albúmina de huevo, que surge como fuente alterna de proteínas comerciales tal es el caso de LB Broth, Peptona o Triptona. Los sustratos mencionados comparten en su composición el triptófano, el cual es un aminoácido esencial y principal precursor de la ruta metabólica de violaceína. De acuerdo con Attia et al. (2020) la albúmina de huevo posee

entre 1.25 g y 1.50 g de triptófano por cada 100 g de proteína, lo que hace adecuada para ser empleada como sustituto de proteínas comerciales.

La proporción de nutrientes que conforman el medio de cultivo en cada uno de los niveles experimentales es: 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de albúmina de huevo. En tanto que el volumen de los micro ensayos es de 300 ml. Se determinó dicho valor volumétrico debido a que diariamente se extraen 4.5 ml de muestra de cada batch de tal forma que se evite variaciones significativas en el volumen del reactor y se vea afectada la producción bacteriana.

2.5 Viabilización de la bacteria a inocular.

Para el proceso de inoculación se debe viabilizar la bacteria por lo que es necesario realizar un cambio de medio, pasando de placa a un medio líquido (Hindler et al., 1990), siendo la composición de este medio LB Broth en 25 ml agua de mar, propiciando los nutrientes y las condiciones necesarias para el crecimiento bacteriano inicial. Las proporciones del medio son: 20 g/L de LB Broth en agua de mar pasada por luz UV, condiciones que fueron establecidas en estudios previos enfocados en la optimización del medio de cultivo.

Es primordial para una correcta inoculación permitir que el crecimiento bacteriano logre alcanzar la fase exponencia buscando reducir el tiempo de adaptación de la bacteria. Se realiza la lectura en el Varioskan a una densidad óptica de 600 nm (OD_{600}) distribuyendo 200 uL por triplicado del medio anteriormente mencionado en una placa multipocillos 96 para verificar que la absorbancia se encuentre entre 0.35 y 0.40, rango en el cual el crecimiento bacteriano se encuentra dentro de la fase exponencial, si este valor se encontrara por encima de este rango se procede a realizar el debido ajuste empleando agua de mar como solvente.

2.6 Determinación de temperatura óptima

La ejecución de los sistemas de temperaturas empezó con la preparación del medio de cultivo aplicando las proporciones y volúmenes anteriormente descritos. Las temperaturas experimentales aplicadas en el proyecto son: 20°C, 27°C, 30°C y 35°C. Se toma como punto de partida el estudio enfocado en producción de violaceína empleando *Pseudoalteromonas luteoviolacea* en medios de peptona y extracto de levadura a 24 °C. Con el propósito de ir acotando los rangos, se seleccionaron dos temperaturas extremas y dos próximas al valor teóricamente establecido. Los extremos (20°C y 35°C) se fijan para determinar si son valores que causan un impacto favorable o no en el crecimiento bacteriano y por tanto producción del pigmento.

Variando cada nivel de los parámetros, sea de temperatura, pH, aireación o agitación, la bacteria se encuentra expuesta a diferentes tipos de estrés, lo que provoca mayor o menor producción de violaceína como un mecanismo de defensa contra factores externos. (Menon et al., 2024)

Los ensayos son llevados a cabo por triplicado en cada condición para garantizar la fiabilidad de los resultados y replicabilidad del proceso. Adicionalmente, para disminuir posibles interferencias se realizan todos los ensayos en condiciones de ausencia de luz.

Una vez inoculados los medios se empieza por el montaje del sistema de temperaturas. Se dispuso de un laboratorio cuyas condiciones permanecen constantes, más específicamente a una temperatura 20°C, lo que lo hizo ideal para situar la muestras de 20°C, en este mismo laboratorio se armó un sistema que simula un baño maría empleando un termómetro de mercurio, una resistencia JAD HT-850 de 50 W y una bandeja plástica rectangular de 12 litros, de tal forma que se mantengan las los ensayos a 27°C durante los 5 días de experimentación, verificando constantemente con el termómetro de mercurio que no se exceda ni se descienda de dicha

temperatura. Para el siguiente nivel se colocan las muestras en una incubadora BIOBASE PCHB-D8000 seteada a 30°C. Finalmente, para mantener las muestras a 35°C se emplea el equipo Baño de agua termostataado marca Memmert.

2.7 Determinación de pH óptimo

La preparación inicial de los medios de cultivo para micro ensayos se lleva a cabo conforme lo descrito en la sección 2.4, además se mantienen las condiciones de iluminación previamente establecidas en la sección 2.5 y se ejecuta por triplicado a una temperatura de 25°C. Los factores de pH a estudiar son 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5.

Se extrajeron 4 mL de cada reactor y se registró el pH inicial, obteniendo lecturas que se encuentran en un rango de 7.4 y 7.5. Se procede inicialmente a acidificar las muestras tomando 10 ml de una solución de ácido clorhídrico 0.1 N hasta alcanzar un pH entre 5.47 y 5.5. El siguiente nivel de pH es de 6.5 por lo que se emplean 5 ml de la solución de ácido clorhídrico previamente establecida. Con la finalidad de tener un control se cuenta con ensayos cuyo pH no es modificado y su valor fue establecido al inicio del proceso. Para alcalinizar las muestras se adicionaron 8 mL de una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1N hasta alcanzar un pH de 8.5.

2.8 Determinación de aireación óptima

Este proceso se llevó a cabo según el protocolo descrito en la sección 2.4 concerniente a preparación de medios en micro ensayos, sin embargo, en este caso se emplearon kitsatos como envases. Para permitir el flujo de aire en cada reactor se armó un sistema de distribución el cual consiste inicialmente en el uso de una bomba marca JAD SC7500 de 3.5W, la cual va conectada a un filtro con la finalidad de evitar posibles contaminaciones por partículas suspendidas en el aire, para regular el flujo de entrada en cada reactor se emplearon manifolds de plástico.

Se estableció un control el cual consiste en muestras que no serán conectadas al sistema de aireación y corresponderán al factor de cero burbujas por minuto, posteriormente se establecen las muestras cuya aireación es baja y mantendrán un flujo entre 15 y 20 burbujas por minuto, para la aireación media se establece un rango que va entre las 30 y 40 burbujas por minuto, finalmente las muestras concernientes a aireación alta tendrán un flujo entre 60 y 70 burbujas por minuto. Estas estimaciones corresponden a los siguientes valores: 1.31 ml/min (aireación baja), 2.62 ml/min (aireación media) y 3.93 ml/min (aireación alta).

Dado que los reactores están expuestos a posible contaminación por la complejidad del sistema es necesario realizar un control microbiológico al finalizar el proceso para garantizar que el rendimiento no se vea afectado por la presencia de bacterias contaminantes distintas a *Pseudoalteromonas*. Para lo cual se empleó un Ensayo de detección de contaminación microbiana mediante diluciones seriadas y siembra en medio sólido.

2.9 Recolección de datos

Los ensayos experimentales se llevaron a cabo por triplicado y fueron monitoreados cada 24 horas durante 120 horas (5 días). En cada uno de los niveles de los parámetros se recolectaron alícuotas de 1.5 mL en tubos Eppendorf autoclavados de igual capacidad por triplicado, los cuales son almacenados en un refrigerador a baja temperatura evitando el crecimiento bacteriano, condición que permite conservar las muestras tomadas para la cuantificación de violaceína al finalizar la experimentación. Adicionalmente se tomaron 200 uL de cada réplica para llevar un control del crecimiento bacteriano de cada nivel.

2.10 Cuantificación de violaceína

- Se distribuyó 250 μ L de cada muestra en tubos Eppendorf previamente pesados.

- Se completó el volumen de cada tubo a 1.5 ml usando una solución salina autoclavada (NaCl al 0.85%).
- Las muestras se centrifugaron a 7812 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en la solución salina autoclavada, llevando al mismo volumen utilizado inicialmente.
- Se repitió el proceso de centrifugación a las mismas condiciones. El sobrenadante se descartó y el pellet se deja secando en una estufa a 45°C durante 1 hora.
- Se pesaron los tubos secos y se agrega 1 ml de una solución de ácido acético al 5% (v/v) en etanol por cada 0.5 mg de biomasa seca.
- Las muestras se incubaron a 30°C por un periodo de 4 horas, bajo agitación constante a 180 rpm.
- Se llevaron los tubos a un tubo ultrasónico por 5 minutos, repitiendo el ciclo 3 veces con pausas de 2 minutos.
- Se centrifugaron nuevamente los tubos con la solución a 7812 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante, que contiene el extracto de violaceína, se transfirió cuidadosamente a unos nuevos tubos Eppendorf previamente pesados.
- Se tomaron 150 µL de cada muestra y se colocaron por triplicado en una placa de 96 pocillos para realizar la lectura de absorbancia a 580 nm.
- El volumen restante del extracto se secó en la estufa a 50°C durante 60 minutos.

- Finalmente, se pesaron los tubos con la violaceína totalmente seca. La diferencia de peso final y el inicial correspondió a la cantidad de violaceína extraída, la cual se expresa como concentración en g/L

2.11 Escalamiento del proceso de producción.

Una vez que se haya completado los ensayos con los diferentes parámetros evaluados, se procedió a llevar a cabo la simulación en Aspen Batch Process Development. Este es un software que permite modelar procesos de una escala de laboratorio a una planta piloto.

El volumen del reactor batch simulado fue de 20 L, en el que se debió cargar previamente los reactivos que conforman la biosíntesis de violaceína, sin embargo, debido a la complejidad de la reacción se realizaron varias simplificaciones que facilitaron la simulación, entre ellas la conversión del reactivo clave de la reacción que en este caso es la albúmina, violaceína como un único producto clave, el calor de reacción es despreciable. De esta manera se logró obtener datos de producción de violaceína y de costos operacionales, que permiten establecer las bases para un potencial escalado y con ello una producción sostenible.

Capítulo 3

3. Resultados y análisis

3.1 Introducción al análisis de resultados

En esta sección se destaca los resultados obtenidos durante el proceso experimental, detallando la configuración de los sistemas, posibles fuentes de error y la concentración de violaceína expresada en mg/L en cada uno de los ensayos. Teniendo como finalidad validar de manera experimental los diferentes parámetros para una biosíntesis factible de violaceína a partir de *Pseudoalteromonas luteoviolacea*. A partir de los datos obtenido se proporciona una base para el escalado de biorreactores abriendo la posibilidad de aplicaciones biotecnológicas.

3.2 Preparación y descontaminación de albúmina

Para un adecuado crecimiento bacteriano y producción de violaceína, es primordial la elección del sustrato que conformará el medio de cultivo. Los ensayos que se detallarán a partir de ahora se ha hecho uso de la albúmina de huevo como principal fuente de proteína. Esta albúmina de huevo se preparó a partir de huevos de la marca La Quinta Bonita.

El proceso de producción y descontaminación de albúmina es el descrito en la sección 2.2.1 y 2.2.2 respectivamente. Se estableció que durante 5 minutos la albúmina será irradiada con luz UV con intervalos de 2 minutos de descanso. Para determinar el impacto de la irradiación de luz UV sobre la albúmina se realizó un análisis de cuantificación de proteína mediante la fórmula de Warburg-Christian; la cual se establece como:

$$1.55_{A280} - 0.76_{A260} \quad (3.1)$$

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.1, Tabla 3.2 y Tabla 3.3 para la primera, segunda y tercera preparación de albúmina, respectivamente, donde se evidencia una disminución parcial en la concentración de proteína, presentando una reducción promedio de 7.51%, sugiriendo que el tiempo de irradiación de luz UV es adecuado para su descontaminación. Este procedimiento

se realizó en las tres veces que se preparó albúmina para tener constancia de su replicabilidad, obteniendo un total de 383 g de albúmina preparada durante todo el tiempo que duró la experimentación, de los cuales 302 g fueron empleados en los diferentes medios de cultivo.

Tabla 3.1 *Concentración promedio de proteína en albúmina de la primera preparación.*

Concentración promedio de proteína (mg/L)	
Sin UV	Con UV
1832,5	1671,1

Tabla 3.2 *Concentración promedio de proteína en albúmina de la segunda preparación.*

Concentración promedio de proteína (mg/L)	
Sin UV	Con UV
1822,9	1691,8

Tabla 3.3 *Concentración promedio de proteína en albúmina de la tercera preparación.*

Concentración promedio de proteína (mg/L)	
Sin UV	Con UV
1737,5	1624,7

Con el propósito de explorar las opciones comerciales de albúmina y comparar costos, se adquirió un lote de 1 kg de la marca OVOBRAND, sin embargo, una vez realizados los ensayos quedó evidenciado que dicha proteína comercial no proporcionó nutrientes necesarios para una favorable producción de violaceína, mostrando apenas una ligera pigmentación en un gramo de los ensayos a 27°C, quedando totalmente descartada. El proceso de cuantificación no fue requerido en estos ensayos debido a la nula pigmentación.

Realizando una comparativa de costos entre las dos albúminas se obtuvo que la albúmina preparada tiene un costo de \$0.032/g, mientras que el costo de la albúmina comercial es de \$0.033/g, una diferencia mínima, sin embargo, si se compara con otros sustratos comerciales como Triptona, Peptona, cuyos precios son \$0.50/g, \$0.48/g, respectivamente, la diferencia es muy considerable.

3.3 Evaluación a diferentes Temperaturas

Los primeros ensayos realizados fueron aquellos donde se evaluó diferentes niveles de temperatura. Los resultados presentados en la Tabla 3.4 muestran que la mayor concentración de violaceína se obtuvo a 27 °C, alcanzando 2,53 mg/L, lo que convierte a esta condición en la más favorable. A temperaturas más bajas, como 20 °C, la producción decayó a 1,48 mg/L, mientras que, a temperaturas más altas, como 30 °C y 35 °C, se obtuvieron 1,92 mg/L y 2,20 mg/L, respectivamente. Evidenciando que el rango de producción óptimo se encuentra en torno a los 27 °C, mientras que desviaciones hacia temperaturas menores o mayores afectan la síntesis del pigmento, confirmando lo que se establece en [Haga clic o pulse aquí para escribir texto](#).

La temperatura regula la velocidad de las reacciones enzimáticas y producción de metabolitos secundarios. A 20 °C, la reacción es más lenta, lo que limita la producción. En cambio, a temperaturas más elevadas, aunque la reacción es más rápida, se incrementa también el riesgo de desnaturalización de enzimas y estrés celular, reduciendo la producción de violaceína. Sin embargo, también logra destacar la temperatura de 35°C, que durante el tiempo que duró los ensayos (5 días) se observó la formación de una biopelícula delgada en la superficie del medio a partir del día 2 la cual se muestra en la Figura 3.1, donde se acumulaba materia y que, al momento de agitar el medio para la toma de muestras, la biopelícula se deshacía y teñía de un color morado más intenso el medio, este comportamiento se observó desde el día 2 hasta el día 5. A esta temperatura además de probablemente desnaturalizar enzimas, también desnaturaliza las

proteínas, dado que el medio está conformado por albúmina de huevo, al encontrarse en un entorno de temperatura elevada tiende a su desnaturalización, de ahí el porqué de la formación de la biopelícula.

Realizando comparativas entre condiciones, se observa que el paso de 20 °C a 27 °C supuso un aumento superior al 70 % en la concentración de violaceína. Por el contrario, al pasar de 27 °C a 30 °C, la disminución fue marcada, lo que confirma la existencia de un rango óptimo estrecho donde la producción es maximizada.

Tabla 3.4 *Concentración promedio de violaceína al día 5 en ensayos de temperatura*

Temperatura (°C)	Concentración promedio (mg/L)
20	1,48
27	2,53
30	1,92
35	2,20

Figura 3.1 *Formación de biopelícula en ensayos a 35°C*



Figura 3.2 *Concentración de violaceína al día 5 en ensayos de temperatura*

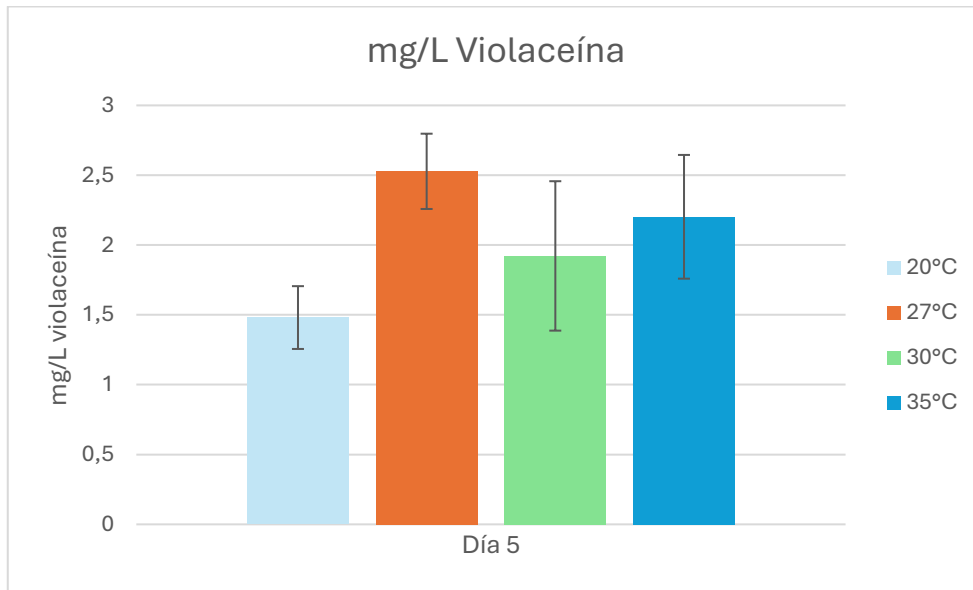
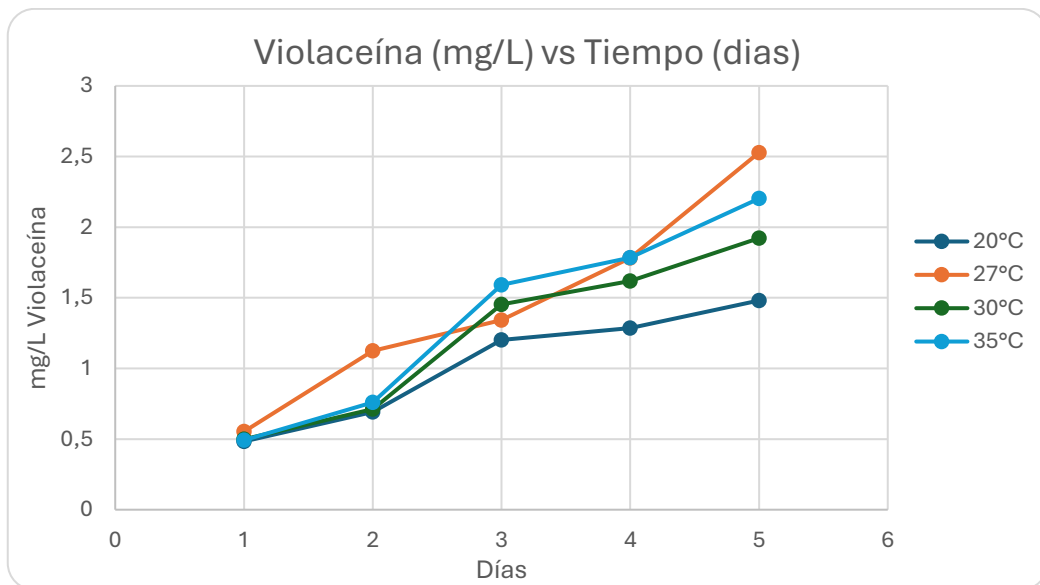


Figura 3.3 Desarrollo de producción de violaceína durante 5 días en ensayos de temperatura



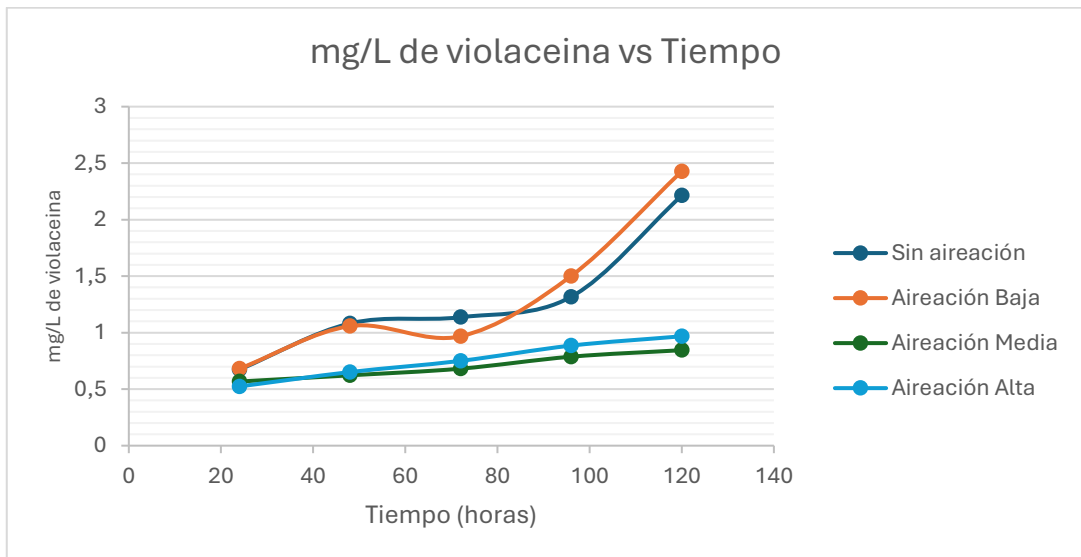
3.4 Evaluación a diferente aireación

El análisis se llevó a cabo con la finalidad de evaluar el efecto de la aireación en la producción de violaceína generada por *Pseudoalteromonas luteoviolacea*. Cada condición se realizó por triplicado ya que esto permite evaluar la reproducibilidad y la consistencia de los valores obtenidos puesto que se pueden comparar resultados reduciendo así la influencia de errores aleatorios y de manipulación al momento de tomar muestras o cuantificar la producción. Las

condiciones iniciales del inóculo son las descritas en la sección 1.1 y el montaje de los sistemas se realizó conforme a lo establecido en la sección 2.2.

Se realizó la toma de muestras de todos los medios durante 5 días por triplicado con la finalidad de obtener un mayor número de datos y garantizar la fiabilidad de los datos tal como se describió anteriormente. A partir de la información obtenida de la cuantificación se elaboró una gráfica que permite supervisar la producción de violaceína en los reactores durante el intervalo de tiempo definido anteriormente.

Figura 3.4 Desarrollo de producción de violaceína durante 5 días en ensayos de aireación



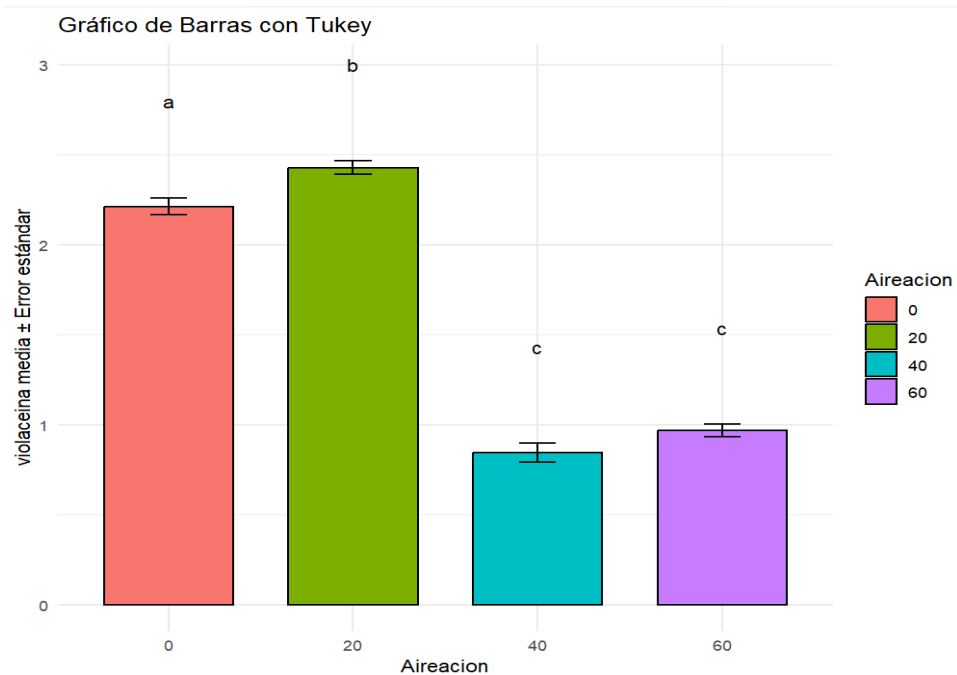
En esta gráfica se puede apreciar que la concentración inicial de violaceína no difiere considerablemente entre las condiciones de aireación nula y baja a excepción del día 3 en la cual se puede apreciar una reducción en la concentración la posible causa se ve ligada a los lavados realizados al cuantificar influyendo así la cantidad final de pigmento disuelto en la solución. Los reactores expuestos a una aireación alta y media no presentan diferencias significativas en cuanto a la concentración.

Tabla 3.5 *Concentración promedio de violaceína al día 5*

Condición	Concentración promedio de violaceína (mg/L)
Sin aireación	2,21
Aireación Baja	2,43
Aireación Media	0,88
Aireación Alta	0,97

En la tabla 3.5 se puede apreciar los valores de violaceína obtenidos tras cinco días de proceso, con la finalidad de evaluar que tan significativas son las diferencias en la producción, se procedió a aplicar la prueba de Tukey denotando así la diferencia entre las medias de los tratamientos a y b los cuales corresponden a las condiciones de aireación nula y baja respectivamente, siendo la mejor condición la aireación baja pues esta presentó una mayor concentración de violaceína. Los resultados de los parámetros de aireación media y alta mostraron valores medios similares por lo que no existe una diferencia significativa entre esos tratamientos, una de las posibles causas del bajo rendimiento en las muestras con aireación media y alta puede ser la formación de compuestos sulfurosos cuyo olor característico resalta en el ambiente, esto se debe a la presencia de la cisteína y metionina presentes en la albúmina.

Figura 3.5 *Gráfico de barras de Tukey de concentración de violaceína*



3.5 Evaluación de agitación

Para este ensayo se tomó en cuenta lo descrito en Yang et al. (2007), donde se expresa que una agitación nula es lo ideal para una mayor producción de violaceína. Un ensayo sin agitación, otro ensayo a 75 rpm (agitación baja) y un tercero a 200 rpm (agitación alta) son los niveles que se evaluaron durante un periodo de 5 días, obteniendo como resultados los tabulados en la Tabla 3.6 donde se resalta que a la nula agitación del medio se alcanzó la mayor concentración de violaceína con 2.1610 mg/L.

Tabla 3.6 Concentración de violaceína al 5to día en ensayos de agitación

Condición	Concentración de violaceína mg/L
Sin agitación	2,16
Agitación baja	1,01
Agitación alta	0,70

Durante el tiempo de experimentación observó que en el ensayo de agitación baja el medio se tornó ligeramente turbio debido a los grumos de albúmina que no se lograron disolver completamente, este mismo tono lo tuvo hasta el día 5 que adoptó el color característico de

violaceína, sin embargo, en comparación al ensayo sin agitación era evidente reconocer la diferencia de coloración. De manera similar ocurrió con el ensayo de agitación alta con la diferencia que al día 5 la coloración del medio tomó un toco color café con ligeras pigmentaciones moradas.

Cualitativamente el medio con mayor producción era aquel que no se agitó, seguido del medio con agitación baja con una concentración de 1.01 mg/L, menos de la mitad que el primer ensayo, y finalmente el a una agitación alta se obtuvo una concentración de 0.70 mg/L, reduciendo tres veces la concentración de pigmento. Este efecto puede deberse a que el volumen ocupado es pequeño por lo que una agitación no es necesaria para una completa incorporación de nutrientes en el medio.

Figura 3.6 *Ensayos de agitación (Baja, alta y nula)*



3.6 Evaluación diferente pH en un volumen de 300 ml

Continuando con la evaluación de parámetros, de acuerdo con lo establecido en la literatura (Menon et al., 2024) se menciona que el mejor pH para un desarrollo óptimo bacteriano y por ende, producción del biopigmento es de 6.5. En ese estudio se usó como fuente de proteína LB Broth, por ello, a fin de alinear dicha metodología con el presente proyecto se sustituyó el sustrato

por albúmina de huevo. Cuando se incorporó la albúmina al medio de cultivo el pH que alcanzó fue de 7.5, por lo que se decidió acidificar el medio aplicando ácido clorhídrico (HCl) 0.1N, disminuyendo el pH hasta 5.5 y 6.5, de manera similar se alcalinizó el medio usando hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N hasta un pH de 8.5.

Finalizados los ensayos, se demostró que el pH tiene un efecto significativo en la biosíntesis de violaceína. La mayor concentración de pigmento se logró a un pH de 6.5 con 1.99 mg/L, mientras que el pH de 5.5 y 8.5 la producción descendió notablemente a 0.66 mg/L y 0.54 mg/L, respectivamente. Este comportamiento puede explicarse porque el pH regula la actividad enzimática y la estabilidad de las proteínas que están presentes en la biosíntesis de violaceína.

En cambio, entre pH 7,5 y 8,5, la disminución de concentración es más gradual pero igualmente significativa. Esto indica que el microorganismo mantiene una zona de estabilidad concentrada alrededor del valor óptimo de 6,5.

Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura, donde se ha señalado que *Chromobacterium violaceum* presentan una mayor síntesis de violaceína en ambientes ligeramente ácidos. De esta forma, se confirma que en *Pseudoalteromonas luteoviolacea* la regulación del pH es un factor clave no solo para la viabilidad celular, sino también para potenciar la producción del pigmento.

Tabla 3.7 Concentración promedio de violaceína al día 5 en ensayos de pH

pH	Concentración promedio violaceína(mg/L)
5,5	0,66
6,5	1,99
7,5	0,88
8,5	0,54

Figura 3.7 Gráfico de barra de concentración de violaceína en ensayos de pH

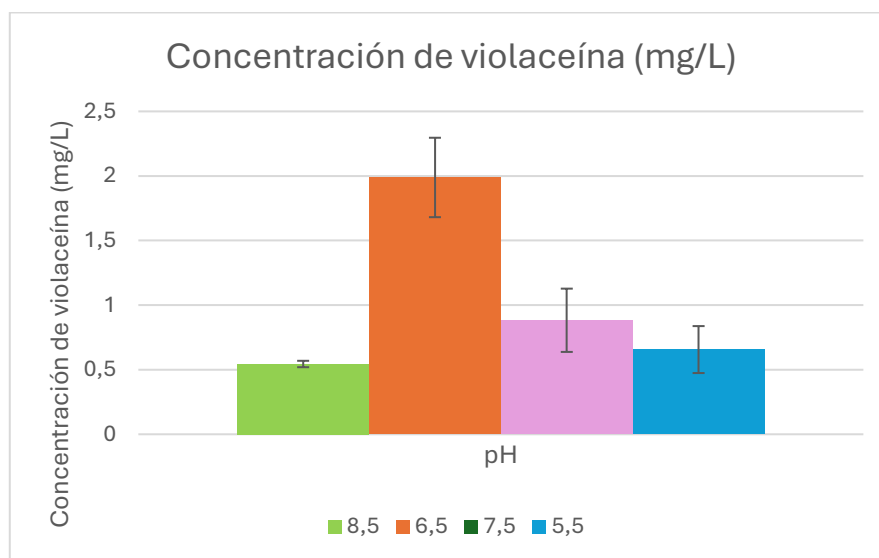
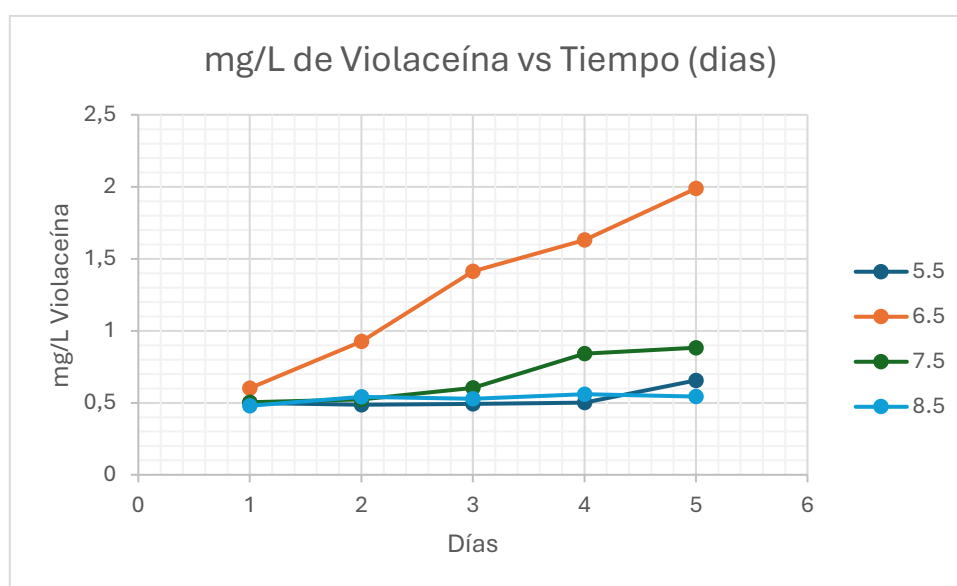


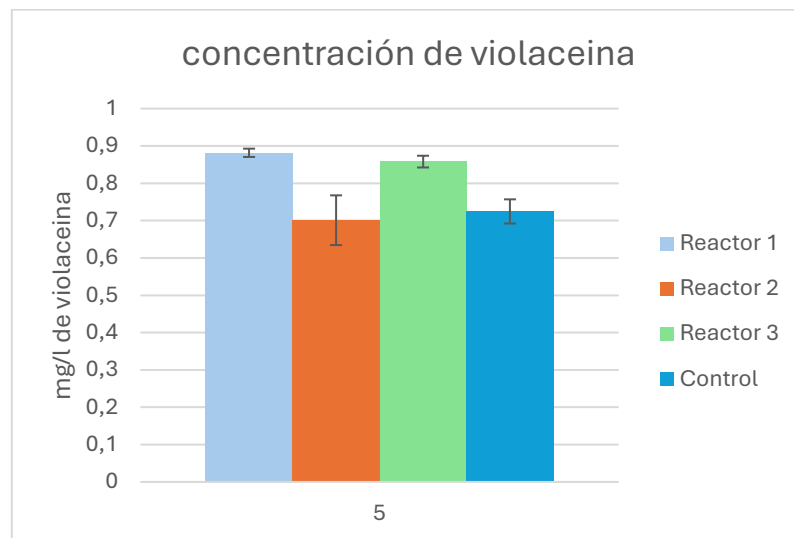
Figura 3.8 Desarrollo de producción de violaceína en ensayos de pH durante 5 días



3.7 Escalado de 300 ml a 1.6 L

Los valores de los parámetros se establecieron basándose en los análisis realizados en los medios de 300 ml, estableciéndose así las condiciones óptimas bajo las cuales la biosíntesis del biopigmento se ve favorecida significativamente. Los valores óptimos de estos factores se establecieron en 3 reactores de 2 litros llenados a tres cuartas partes de su capacidad, para este proceso se mantuvo la forma del reactor

Figura 3.9 Gráfico de barras de la violaceína al 5to día en ensayos de Escalado a 2 L



En la Figura 3.8 se puede apreciar la concentración de violaceína en los reactores en el día 5 del proceso, se puede apreciar el tanto el reactor 1 como el 3 presentan una concentración similar mientras que el reactor 2 presenta una cantidad menor esto se debe a una contaminación del medio la cual fue verificada mediante la toma una alícuota de muestra en la cual se procede a realizar diluciones seriadas para su posterior sembrado en placas, la cual demostró presencia de colonias cuyas características morfológicas diferían tanto en color como en forma. A pesar del bajo rendimiento la producción del reactor dos se equipará a la del reactor de control el cual no fue modificado con los valores óptimos obtenidos.

Figura 3.10 Contaminación de *reactor 2 de escalado a 1.6 L*



Tabla 3.8 *Concentración promedio de violaceína al día 5 en ensayos de escalado*

Reactor	Concentración de violaceína (mg/L)
1	0,88
2	0,75
3	0,86
4	0,72

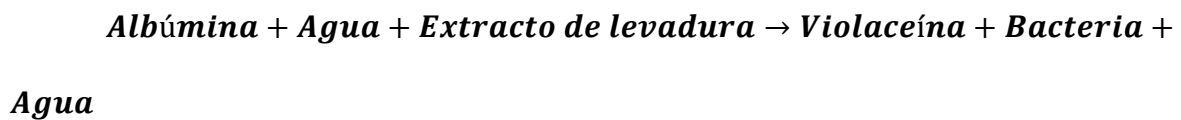
3.8 Simulación de escalado a 20 L en Aspen Batch Process Development

La simulación del proceso de biosíntesis de violaceína se la llevó a cabo mediante el uso del programa Aspen Batch Process Development, que permite por medio de recetas escalar procesos, partiendo de un caso base. El caso base de este proyecto son los ensayos de 300 ml, a partir de los datos obtenidos experimentalmente se realizó el armado de las recetas.

Debido a la complejidad de la reacción, fue necesario realizar simplificaciones y asunciones en el modelo. Se describió en la sección 2.4 que la cantidad de triptófano presente en la albúmina está en un rango de 1.25% y 1.5%, por lo que se tomó la decisión de tomar esa relación y establecerla como porcentaje de conversión del componente clave (albúmina) en la reacción, es

decir 1.25%. Para simular la *Pseudoalteromonas luteoviolacea* se utilizó el componente Bacteria (General) de la librería ASPESV140.FERMENT que simula el comportamiento de una bacteria. Por otro lado, el producto clave de la reacción es la violaceína, que al igual que la albúmina y el extracto de levadura, se cargó sus propiedades ya que el programa no cuenta con dicha información en su base de datos.

La reacción quedó establecida de la siguiente forma:



Una vez simulado el caso base se procedió al escalado del ensayo, llevándolo a una planta piloto con un volumen de 20 L se obtuvo datos como que la producción de violaceína al cabo de 5 días es de 0.0042 kg. El programa también brinda la opción de especificar el tamaño del reactor a partir de una concentración final determinada, en este caso la concentración final de violaceína que se simuló producir es de 0,02 kg, dando como resultado que, para lograr dicha cantidad, el volumen del reactor debe ser de 97.73 L.

3.9 Análisis económico

Partiendo de lo establecido en la sección 3.1, se determinó que la albúmina preparada presenta un costo unitario de \$0.032/g, considerando únicamente la materia prima. Para el periodo en el que se realizaron los ensayos (mayo–agosto de 2025), la tarifa promedio de electricidad en Ecuador fue de \$0.12/kWh. El equipo utilizado para el secado fue en una estufa de 1.4 kW, operada en tres corridas de 12 horas cada una (36 horas en total), complementada con una lámpara UV de 55 W empleada durante 45 minutos. Bajo estas condiciones, el costo de producción de albúmina alcanza los \$0.048/g, valor que se mantiene considerablemente por debajo del costo de las alternativas comerciales, pero que garantiza un desempeño positivo en la producción de violaceína.

En la práctica, para preparar un medio de 300 ml usando albúmina como sustrato tiene un costo de \$1.907 por ensayo, mientras que preparar el mismo volumen de medio usando Peptona o Triptona tiene un costo de \$3.21 y \$3.26 respectivamente

Tabla 3.9 *Costo de materiales*

Material	Costo (\$/g)
Albúmina	0.048
Extracto de levadura	0.32
Agua de mar	0.0043

El análisis del escalado a 2L, los costos asociados a la producción se describen de la siguiente manera: el uso de agua de mar, que representa un gasto de \$6.88 por un volumen de 1.6L; el costo de 16 g de albúmina, que llega a \$0.77; el gasto de 8 g de extracto de levadura que es de \$2.52; y finalmente, el costo de operación de dos resistencias de 50W y dos bombas de aire de 3.5W, que totaliza \$1.49 en un periodo de 120 horas. Como resultado cada ensayo tiene un costo de \$10.54. Dado que se realizaron cuatro replicas, en conjunto, estos costos dan un total de \$42.18.

Finalmente, el escalado a 20 L los costos están tabulados en la Tabla 3.10, resultando en un costo por lote de \$131.92 y una producción de 0.0042 kg de violaceína. A partir de estos datos se obtiene que cada g de violaceína tiene un costo de \$31.41, reduciendo drásticamente en comparación a su opción comercial. Este análisis económico destaca la viabilidad de la producción de violaceína y albúmina de huevo en condiciones controladas, lo que supondría un avance significativo en el ámbito biotecnológico y comercial.

Tabla 3.10 *Costos de producción de simulación de planta piloto a 20 L*

Stream	Component	Unit Cost	Campaign Requirement	Campaign Cost	Percent Cost
		(USD/kg)	(kg)	(USD)	(%)
1.1. Charge-1	Total	4,30	19,88	85,47	64,79
	WATER				
1.2. Charge-4	Total	48,30	0,20	9,66	7,32
	TRIPTOFANO				
1.3. Charge-6	Total	367,88	0,10	36,79	27,89
	LEVADURA				
1.4. Charge-8	Total		0,20		
	BACTERIA(GENERAL)				
Total			20,38	131,92	100,00

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones

4.1.1 Conclusiones

- Se lograron optimizar los parámetros críticos para la biosíntesis de violaceína, siendo las condiciones más favorables una temperatura de 27°C, un pH ligeramente ácido de 6.5, una aireación de 1,31ml por minuto y nula agitación. De manera complementaria, la implementación de un protocolo de descontaminación del sustrato contribuyó al establecimiento de un crecimiento bacteriano estable y selectivo
- Se determinó que el protocolo de descontaminación usando luz UV durante 5 minutos y reposando 2 minutos en un total de 3 ciclos degradaba parcialmente en promedio un 7.51% de la proteína, además posterior al protocolo se realizó diluciones seriadas y se verificó la selectividad del medio al obtener un crecimiento único de *Pseudoalteromonas luteoviolacea*.
- Los ensayos de cuantificación confirmaron que el control de temperatura, pH y aireación permitió incrementar la producción de violaceína. Los parámetros óptimos determinado (pH 6.5, 27°C, 1,31 ml/min) posibilitaron alcanzar concentraciones de hasta 2 mg/L en un periodo de 5 días, lo que demuestra la relevancia de la regularización de variables fisicoquímicas en la productividad del metabolito.
- El proceso de escalamiento de biorreactor 2 L evidenció que el aumento de volumen ocasiona una ligera disminución en la concentración de violaceína, atribuible a limitaciones en los fenómenos de transferencia de masa y momentum. Asimismo, la simulación del escalado a 20 L estimó una producción final de 0,0042 kg de violaceína y proyectó que para alcanzar una producción de 0.02 kg sería necesario aumentar el volumen del reactor hasta 97.93 L, lo que subraya la importancia de las consideraciones de diseño y operación en procesos de bioprocesamiento a gran escala. Los costos de producción de un lote de 20

L de acuerdo con el software fue de \$131.92, dando como resultado que el costo de violaceína es \$31.41/g.

4.1.2 Recomendaciones

- Dado los datos obtenidos en aireación, se evidenció que se puede trabajar tanto con aireación baja como sin aireación, por lo que en reemplazo de una aireación baja se recomienda implementar una agitación baja entre 50 rpm y 75 rpm. Esta estrategia permitirá una mejor homogenización de nutrientes en el medio en los ensayos de 2 L en adelante, favoreciendo así la biosíntesis de violaceína.
- Para resultados más apropiados en un escalamiento del proceso a 20 L, lo ideal es desarrollar experimentalmente la biosíntesis de violaceína en un biorreactor industrial, donde se lleve un riguroso control de los parámetros claves mencionados a lo largo de este estudio, para el análisis de los efectos de la geometría del reactor y los fenómenos de transferencia de masa y momentum que puedan limitar el rendimiento a escala piloto.
- A fin de maximizar la recuperación de la violaceína producida en el proyecto es factible que se realicen procesos de purificación usando métodos cromatográficos como HPLC. Este enfoque permitirá obtener datos más precisos sobre la concentración de violaceína y sus posibles derivados, facilitando el análisis de la calidad del producto.
- Además de explorar nuevas alternativas de sustratos, se propone la implementación de fuentes de carbono y nitrógeno derivadas de residuos industriales en los ensayos, contribuyendo no solo a la reducción de costos de producción sino también mejorando la viabilidad económica del proceso promoviendo enfoques más sostenibles.
- Se sugiere la implementación de un cromatograma para la identificación y cuantificación de violaceína, reduciendo significativamente el tiempo empleado para la cuantificación con el método convencional, de esta forma se brindaría una mayor precisión y reproducibilidad

de los resultados. El uso de HPLC es una alternativa para la evaluación de la pureza y rendimiento de la violaceína, facilitando la validación de los parámetros de producción.

- Emplear un Biorreactor con la finalidad de garantizar la fabricación continua de violaceína, buscando equivalencia entre lotes mediante el control de los parámetros críticos de proceso y la aplicación de control estadístico del proceso, manteniendo los atributos críticos de calidad establecidos previamente dentro de sus especificaciones para asegurar la idoneidad del material para uso clínico.

Referencias

- Akhunzianov, A. A., Rozhina, E. V., Filina, Y. V., Rizvanov, A. A., & Miftakhova, R. R. (2025). Resistance to Radiotherapy in Cancer. In *Diseases* (Vol. 13, Issue 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/diseases13010022>
- Alker, A. T., Delherbe, N., Purdy, T. N., Moore, B. S., & Shikuma, N. J. (2020). Genetic examination of the marine bacterium *Pseudoalteromonas luteoviolacea* and effects of its metamorphosis-inducing factors. *Environmental Microbiology*, 22(11). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15211>
- Alshammari, F. H., & Hussein, H. A. A. (2022). Sterilization of paper during crisis. *AMB Express*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01345-6>
- Atlas, R. M. . (2010). *Handbook of microbiological media*. Boca Raton, Fla. : CRC Press.
- Attia, Y. A., Al-Harhi, M. A., Korish, M. A., & Shiboob, M. H. (2020). Protein and amino acid content in four brands of commercial table eggs in retail markets in relation to human requirements. *Animals*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/ani10030406>
- Berger, K., Fischer, T., & Szucs, T. D. (1998). Cost-effectiveness analysis of paclitaxel and cisplatin versus cyclophosphamide and cisplatin as first-line therapy in advanced ovarian cancer. A European perspective. *European Journal of Cancer*, 34(12). [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00260-3](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00260-3)
- Bryer, E., & Henry, D. (2018). Chemotherapy-induced anemia: etiology, pathophysiology, and implications for contemporary practice. *International Journal of Clinical Transfusion Medicine, Volume 6*. <https://doi.org/10.2147/ijctm.s187569>
- Chen, Y., Li, Y., Huang, L., Du, Y., Gan, F., Li, Y., & Yao, Y. (2021). Antioxidative Stress: Inhibiting Reactive Oxygen Species Production as a Cause of Radioresistance and

- Chemoresistance. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2021). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2021/6620306>
- Choi, S. Y., Kim, S., Lyuck, S., Kim, S. B., & Mitchell, R. J. (2015). High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigra* str. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, *5*. <https://doi.org/10.1038/srep15598>
- de Carvalho, D. D., Costa, F. T. M., Duran, N., & Haun, M. (2006). Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicology in Vitro*, *20*(8), 1514–1521. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.06.007>
- Deleemans, J. M., Chleilat, F., Reimer, R. A., Henning, J. W., Baydoun, M., Piedalue, K. A., McLennan, A., & Carlson, L. E. (2019). The chemo-gut study: Investigating the long-term effects of chemotherapy on gut microbiota, metabolic, immune, psychological and cognitive parameters in young adult Cancer survivors; Study protocol. *BMC Cancer*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6473-8>
- Deschuymer, S., Nevens, D., Duprez, F., Daisne, J. F., Dok, R., Laenen, A., Voordeckers, M., De Neve, W., & Nuyts, S. (2020). Randomized clinical trial on reduction of radiotherapy dose to the elective neck in head and neck squamous cell carcinoma; update of the long-term tumor outcome. *Radiotherapy and Oncology*, *143*. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2020.01.005>
- Durán, N., J. Fávoro, W., C. de Castro, S., Nakazato, G., R. Castro, G., Z. Justo, G., & Tasic, L. (2025). New Advancements in Production, Purification, and Current Biological Activities of Violacein. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20250096>
- Durán, N., Justo, G. Z., Ferreira, C. V., Melo, P. S., Cordi, L., & Martins, D. (2007). Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *48*(3), 127–133. <https://doi.org/10.1042/ba20070115>

- Fisher, C. J., & Goswami, P. C. (2008). Mitochondria-targeted antioxidant enzyme activity regulates radioresistance in human pancreatic cancer cells. *Cancer Biology and Therapy*, 7(8), 1271–1279. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.8.6300>
- Füller, J. J., Röpke, R., Krausze, J., Rennhack, K. E., Daniel, N. P., Blankenfeldt, W., Schulz, S., Jahn, D., & Moser, J. (2016). Biosynthesis of violacein, structure and function of L-tryptophan oxidase VioA from chromobacterium violaceum. *Journal of Biological Chemistry*, 291(38), 20068–20084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.741561>
- Gwon, D. A., Seok, J. Y., Jung, G. Y., & Lee, J. W. (2021). Biosensor-assisted adaptive laboratory evolution for violacein production. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22126594>
- Hashimi, S. M., Xu, T., & Wei, M. Q. (2015). Violacein anticancer activity is enhanced under hypoxia. *Oncology Reports*, 33(4). <https://doi.org/10.3892/or.2015.3781>
- Hindler, J. A., Gonzalez, A. H., & Drake, T. A. (1990). Stability of Viable-Bacterium Counts in Liquid Media Used for Preparation of Inocula and Subsequent Impact on Antimicrobial Susceptibility Test Results. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*.
- McMENAMY, R. H., & ONCLEY, J. L. (1958). The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. *The Journal of Biological Chemistry*, 233(6). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)49353-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)49353-2)
- Menon, R., Thomas, R., Sood, N., & Gokhale, T. (2024). Marine Phytoplankton: Bioactive Compounds and Their Applications in Medicine. In *Marine Bioactive Molecules for Biomedical and Pharmacotherapeutic Applications* (pp. 197–223). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-99-6770-4_13
- Montaner, B., & Pérez-Tomás, R. (2001). Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. In *Life Sciences* (Vol. 68).

- Nahariah, N., Legowo, A. M., Abustam, E., & Hintono, A. (2015). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor activity on egg albumen fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(6), 855–861. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0419>
- Obianwuna, U. E., Oleforuh-Okoleh, V. U., Wang, J., Zhang, H. J., Qi, G. H., Qiu, K., & Wu, S. G. (2022). Natural Products of Plants and Animal Origin Improve Albumen Quality of Chicken Eggs. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.875270>
- Pöhlmann, J., Weller, M., Marcellusi, A., Grabe-Heyne, K., Krott-Coi, L., Rabar, S., & Pollock, R. F. (2024). High costs, low quality of life, reduced survival, and room for improving treatment: an analysis of burden and unmet needs in glioma. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1368606>
- Pucci, C., Martinelli, C., & Ciofani, G. (2019). Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. In *ecancermedicalscience* (Vol. 13). ecancer Global Foundation. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>
- Rodrigues, A. L., Trachtmann, N., Becker, J., Lohanatha, A. F., Blotenberg, J., Bolten, C. J., Korneli, C., de Souza Lima, A. O., Porto, L. M., Sprenger, G. A., & Wittmann, C. (2013). Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein. *Metabolic Engineering*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.08.004>
- Soliev, A. B., Hosokawa, K., & Enomoto, K. (2011). Bioactive pigments from marine bacteria: Applications and physiological roles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/670349>

- Tilsed, C. M., Fisher, S. A., Nowak, A. K., Lake, R. A., & Lesterhuis, W. J. (2022). Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.960317>
- Timmermans, M. L., Picott, K. J., Ucciferri, L., & Ross, A. C. (2019). Culturing marine bacteria from the genus *Pseudoalteromonas* on a cotton scaffold alters secondary metabolite production. *MicrobiologyOpen*, 8(5). <https://doi.org/10.1002/mbo3.724>
- Tominaga, H., Kodama, S., Matsuda, N., Suzuki, K., & Watanabe, M. (2004). Involvement of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Induction of Genetic Instability by Radiation. In *J. Radiat. Res* (Vol. 45, Issue 2). <http://jrr.jstage.jst.go.jp>
- Yang, L. H., Xiong, H., Lee, O. O., Qi, S. H., & Qian, P. Y. (2007). Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Letters in Applied Microbiology*, 44(6), 625–630. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02125.x>
- Zafar, A., Khatoon, S., Khan, M. J., Abu, J., & Naeem, A. (2025). Advancements and limitations in traditional anti-cancer therapies: a comprehensive review of surgery, chemotherapy, radiation therapy, and hormonal therapy. In *Discover Oncology* (Vol. 16, Issue 1). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-02198-8>
- U.S. Food and Drug Administration. (2018). U.S. Food and Drug Administration. *The Drug Development Process*. <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-2-preclinical-research>
- Implen GmbH. (2020). *OD600 measurement for cell density: Bacterial and yeast growth*. Implen. <https://www.implen.de/od600-cell-density-bacterial-growth-yeast-growth>
- INEN. (2022). INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos).

INEC (*Instituto Nacional de Estadística y Censos*). <https://www.ecuadorencifras.gob.ec>

Sigma-Aldrich. (2025). Sigma-Aldrich *Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services*.

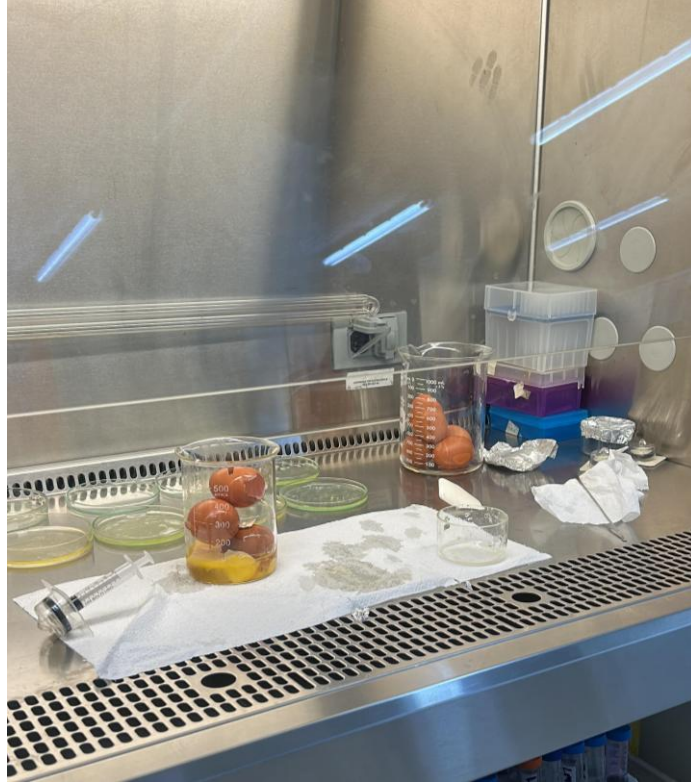
Merck. <https://www.sigmaaldrich.com/EC/en>

Creative BioMart. (2025). *Principle and protocol of protein concentration measurement by UV*.

<https://www.creativebiomart.net/resource/principle-protocol-principle-and-protocol-of-protein-concentration-measurement-by-uv-429.htm>

Anexos

Anexo 1 *Preparación de albúmina de huevo*



Anexo 2 *Preparación de medios de cultivo*



Anexo 3 *Ensayos de temperatura a 20°C*



Anexo 4 *Ensayos de temperatura a 27°C*



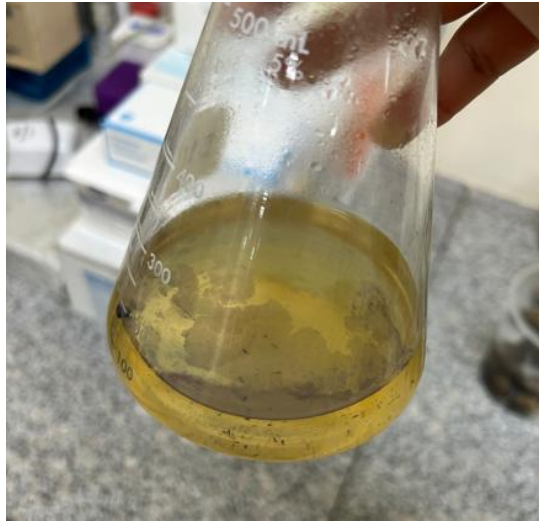
Anexo 5 *Ensayos de temperatura a 30°C*



Anexo 6 *Ensayos de temperatura a 35°C*



Anexo 7 *Formación de biopelícula en muestras a 35°C*



Anexo 8 *Preparación del sistema de ensayos con aireación*



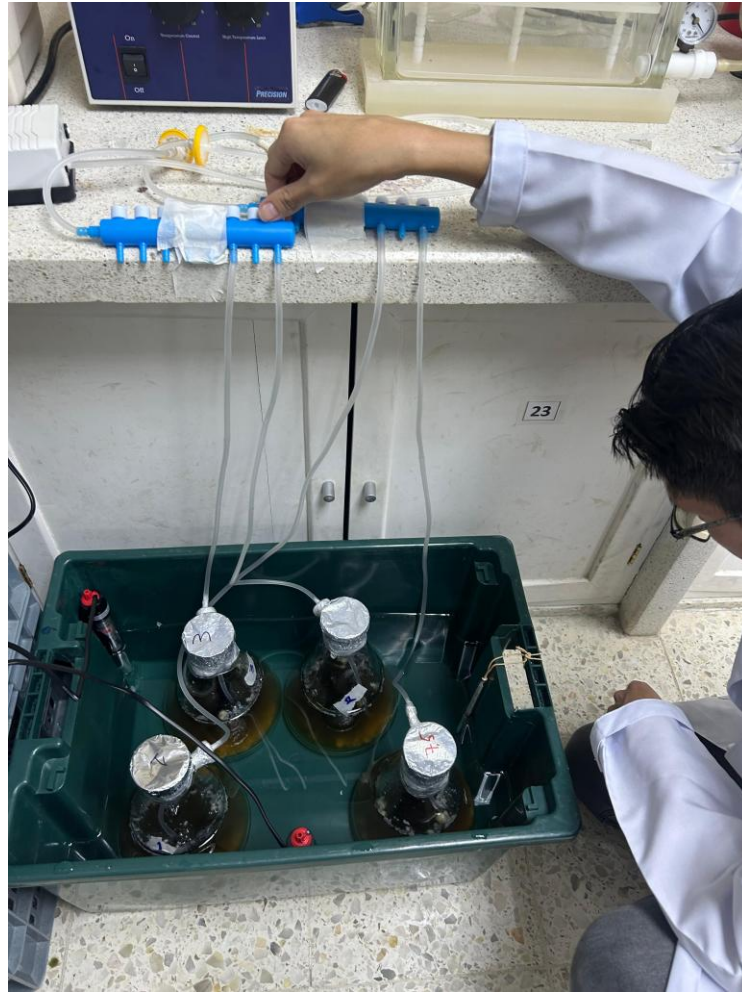
Anexo 9 Sistema montado de ensayos con aireación



Anexo 10 *Violaceína seca*



Anexo 81 *Montaje de sistema de escalados a 1.6 L*



Anexo 12 *Diferentes volúmenes de ensayos (50 ml, 300 ml, 1600 ml)*

