

Vitae

REVISTA DE LA FACULTAD DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA



ISSN 0121-4004 / ISSN-e 2145-2660
Volumen 19 número 3, 2012. pp. 312
Medellin, Colombia.

EDITORIAL

PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LIPASAS MICROBIANAS, UNA ALTERNATIVA SOSTENIBLE PARA LA UTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF MICROBIAL LIPASES, A SUSTAINABLE ALTERNATIVE TO THE USE OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES

Lipasas

Los lípidos son biomoléculas orgánicas ampliamente distribuidas en la biomasa de la tierra, siendo las enzimas denominadas lipolíticas o lipasas las encargadas de la degradación de estas moléculas insolubles en agua. Las lipasas se han estudiado desde hace más de 300 años, sin embargo, su capacidad para catalizar la hidrólisis y sintetizar esteres ha sido reconocida apenas hace 70 años (1). Este tipo de enzimas revisten de gran importancia en la industria por sus múltiples aplicaciones debido a que llevan a cabo la degradación de sustratos con alto contenido graso así como en reacciones de esterificación en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. Las lipasas han sido encontradas en muchas especies de animales, plantas y microorganismos. Sin embargo, las lipasas microbianas son mucho más versátiles y presentan características interesantes como estabilidad en solventes orgánicos, actividad bajo diversas condiciones, alta especificidad de sustrato, así como regio y enantio selectividad (2).

Las lipasas son sintetizadas por los microorganismos preferencialmente en presencia de inductores como son los lípidos. Estas moléculas y otras sustancias presentes en los residuos agroindustriales permiten el crecimiento de los microorganismos y actúan como sustancias inductoras para la producción de lipasas microbianas. Se ha demostrado que los aceites naturales como el aceite de soya, los ácidos y ésteres grasos como los jabones, los esteroides como el colesterol, las sales biliares y detergentes se comportan como inductores y por ello son ampliamente utilizados para la producción de lipasas microbianas (3). Se ha encontrado que los niveles de producción de lipasas microbianas varían significativamente entre las diferentes especies de microorganismos, por ello es indispensable la presencia de una fuente de carbono de naturaleza lipídica (4).

Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas

Hoy en día los procesos desarrollados en la industria que son catalizados por enzimas son mucho más numerosos, debido a que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores no biológicos convencionales. Las lipasas microbianas constituyen uno de los grupos más importantes de biocatálisis por sus amplias e importantes aplicaciones en la industria alimentaria, como la producción de grasas con propiedades físicas y químicas deseables, además de contener una baja proporción de grasas trans en el producto final, a diferencia de los procesos de hidrogenación y transesterificación química. Estas enzimas catalizan una amplia variedad de reacciones como la hidrólisis parcial o total de triacilglicéridos y reacciones de esterificación, transesterificación e interesterificación de los lípidos en medios no acuosos (5). El interés en la producción biotecnológica de las lipasas radica en sus diversas aplicaciones como aditivos alimentarios en la modificación del sabor, síntesis de ésteres con una importante actividad antioxidante, hidrólisis de grasas para la fabricación de detergentes, tratamiento de aguas residuales específicamente en la degradación y remoción de sustratos grasos (aceitosos), eliminación de lípidos y aceites en la industria cosmética y farmacéutica, así como en el tratamiento de los cueros en la industria marroquinera (6). Así mismo, recientemente gracias a su capacidad para llevar a cabo reacciones de transesterificación las lipasas han adquirido un papel muy importante en la producción de biocombustibles, como resultado de la creciente demanda mundial en el uso de energía renovable.

A pesar de las grandes ventajas que representa la aplicación de las lipasas en diferentes tipos de industrias, frecuentemente sus altos costos de producción limitan su uso. Por ello, la investigación se ha enfocado en la búsqueda y utilización de diferentes microorganismos y sustratos que permitan obtener a escala industrial estas enzimas utilizando condiciones de operación que faciliten la reducción de los costos de producción y se convierta en un proceso biotecnológico económicamente viable. Lo anterior puede lograrse con el empleo de sustratos económicos considerados como un desecho como son los residuos agroindustriales.

Microorganismos productores de Lipasas

Los microorganismos con un alto potencial para producir lipasas pueden ser encontrados en diferentes hábitats, principalmente en desechos o residuos de aceites vegetales empleados en la elaboración de frituras, industrias de productos lácteos, suelos contaminados con aceites y alimentos deteriorados. Lo anterior indica que el mismo ambiente natural nos ofrece un amplio potencial para aislar nuevas fuentes de lipasas con propiedades novedosas. A partir de éstos nichos se han aislado bacterias, hongos filamentosos, levaduras y actinomicetos, entre los que sobresalen los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Candida*, *Aspergillus* y *Geotrichum* sp por su capacidad para producir lipasas extracelulares, facilitando de esta manera, la recuperación de estas enzimas a partir del medio de cultivo (7). Dado que las lipasas se encuentran entre las enzimas más ampliamente utilizadas en procesos biotecnológicos y en procesos químicos, la investigación se ha enfocado en la búsqueda de nuevos microorganismos con diferentes propiedades lipolíticas deseadas.

A pesar del gran número de microorganismos productores de lipasas, sólo unas pocas especies de bacterias se han evaluado para la producción de lipasas adaptadas al frío. Se ha reportado algunas cepas productoras de lipasas a temperaturas bajas como *Acinetobacter* sp., *Achromobacter lipolyticum*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus sphaericus*, *Photobacterium lipolyticum*, *Morexella* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Psychrobacter okhotskensis*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus epidermidis* (8).

Asimismo, se ha evaluado diferentes especies de los mohos como *Aspergillus* y *Penicillium* para la producción de lipasas extracelulares en medios de cultivo sólidos y líquidos utilizando como agente inductor aceite de oliva. De estos estudios se ha encontrado que las especies *A. alliaceus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. fischeri*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. sundarbanii*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. camemberti*, *P. chrysogenum* I, *P. coryniferum* I, *P. crustosum*, *P. egyptiacum*, *P. expansum* y *P. spiculispurum* presentan los más altos niveles de producción de lipasas, representando una importante fuente y un gran potencial para su producción biotecnológica (9).

Entre las levaduras, el género *Cándida* es el microorganismo que presenta el mayor potencial para producción de lipasas que ha sido reportado en la literatura. Las lipasas producidas por *C. rugosa* se han convertido en unas de las más utilizadas por la industria, debido a su alta actividad en procesos tanto de hidrólisis como de síntesis, por ejemplo en la producción de ácidos grasos a partir de aceite de ricino (10). Se ha reportado otras levaduras potenciales productoras de lipasas con altos niveles de producción tales como *Trichosporon asahii* (11), *Candida cylindracea* (12); *Aureobasidium pullulans* (13), *Saccharomyces cerevisiae* (14); *Yarrowia lipolytica* (15); *Pseudozyma hubeiensis* HB85A, *Debaryomyces occidentalislike* HB83 y *Cryptococcus* sp. HB80 (16).

Sustratos agroindustriales

Como ya se mencionó, una gran variedad de microorganismos secretan lipasas durante su crecimiento en residuos orgánicos y agroindustriales, ya que éstos contienen una abundante fuente de nutrientes que sirve como medio de cultivo para que los microorganismos sean capaces de producir estas enzimas. Sin embargo, no existe una amplia disponibilidad de lipasas que presenten características específicas para un determinado tipo de aplicación. Esto último representa un factor limitante y es por ello que la investigación de nuevas enzimas lipasas con características diferentes, así como la determinación de las condiciones óptimas para la producción de dichas enzimas a partir de desechos o residuos agroindustriales continúa siendo de gran interés. De ésta manera, la producción de lipasas es un proceso que en gran medida depende del microorganismo empleado. Sin embargo, además del microorganismo también desempeñan un papel fundamental en el proceso de producción de estas enzimas el tipo de cultivo, ya sea mediante fermentación líquida o en estado sólido, la composición del medio y el tipo de reactor.

Los residuos agroindustriales son un gran problema ambiental ya que representan un importante desecho de una gran variedad de industrias, principalmente las del sector alimenticio. Generalmente, estos residuos son vertidos al ambiente, lo que conlleva a la contaminación ambiental, principalmente de los cuerpos de agua y suelos. Algunos usos dados a este tipo de residuos es, por ejemplo, utilizarlos como alimento para ganado. Sin embargo esta estrategia sólo resuelve de manera parcial el problema, ya que el volumen en que son generados estos desechos es mayor que el de su demanda como alimento. Por lo anterior, hoy en día, los residuos agroindustriales representan un gran potencial para ser empleados en procesos de base biotecnológica, debido a su bajo costo y su composición nutricional, ya que representan una fuente importante de carbono, nitrógeno y minerales, que pueden ser utilizados como sustrato para el crecimiento de los microorganismos y la producción de compuestos de alto valor agregado derivados de su metabolismo, como el caso de las lipasas. De ésta manera, se contribuye a la resolución de problemáticas de contaminación ambiental causados por la disposición de estos residuos; además, se reduce la emisión de dióxido de carbono al ambiente.

Los residuos obtenidos a partir de la extracción de aceites han sido utilizados para la producción de lipasas, principalmente por medio de fermentación en estado sólido, dado que los contenidos grasos residuales se comportan como agentes inductores para la producción de lipasas. Una gran variedad de residuos agroindustriales derivados del salvado y bagazo de maíz, trigo, arroz, soya, cebada y caña de azúcar así como las pastas o residuos grasos de semillas de oliva y girasol han sido reportados como muy efectivos para la producción de lipasas (17).

Los residuos agroindustriales derivados de las industrias alimenticias empleados para la producción de lipasas contienen tanto sustratos fácilmente asimilables como sustratos no asimilables y compuestos de naturaleza lipídica que permiten el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos y a su vez actúan como inductores para la producción de lipasas microbianas. Además del aporte de nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos por parte de los residuos agroindustriales, éstos también permiten que las células microbianas se anclen al sustrato y puedan crecer adheridos a éste. De esta manera, todos los sustratos que proporcionan éstas características para el crecimiento y producción de lipasas por parte de los microorganismos son los sustratos más adecuados para llevar a cabo la producción biotecnológica de estas enzimas.

Dado que algunos residuos agroindustriales están constituidos por matrices poliméricas muy complejas, como la lignina, es necesario realizar algunos pre-tratamientos químicos o mecánicos antes de utilizarlos como sustratos para la producción de enzimas. Los pre-tratamientos térmicos, la hidrólisis química y la reducción del tamaño de partícula frecuentemente son utilizados para incrementar la accesibilidad y biodisponibilidad de los nutrientes para permitir el crecimiento adecuado y la producción de lipasas por parte de los microorganismos (18).

Los residuos agroindustriales fibrosos son subproductos de origen lignocelulósico, que por su contenido de fibra son poco digeribles, pero que por sus características sirven como un buen soporte físico y además proporcionan fuentes de carbono y nutrientes para permitir el crecimiento microbiano. En éste sentido, se ha reportado la producción exitosa de lipasas de *C. rugosa*, *A. niger* y *R. pusillus* mediante fermentación en estado sólido, utilizando como sustrato el salvado de trigo, cascarilla de arroz y maíz, harina de soya o bagazo de caña de azúcar mezclado con desechos grasos a partir de aceite de coco, sésamo y oliva (19). En conclusión, los efluentes de las industrias alimenticias, lácteas y los mataderos contienen una alta concentración de lípidos, donde se encuentra una fuente importante de microorganismos con gran potencial para la producción de lipasas además de poder ser utilizados como sustratos para la producción de estas enzimas.

Angel Emilio Aceves Diez Ph.D.

Gerente de Investigación y Desarrollo. Laboratorios MINKAB S.A. de C.V. (Guadalajara, México).

Laura Margarita Castañeda Sandoval Ph.D.

Profesora de la Universidad de Antioquia. Integrante del Grupo de Investigación Biomicro. Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Der Walle N. Über synthetische Wirkung bakterieller lipasen. Cbl Bakt Parasitenk Inktionskr. 1927; 70: 369-73.
2. Kempka AP, Lipke NR, Pinheiro TLF, Menoncin S, Treichel H, Freire DMG. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2008 Feb; 31 (2): 119 - 25.
3. Ferrer P, Montesinos JL, Valero F, Sola C. Production of native and recombinant lipases by *Candida rugosa*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2001 Sep; 95 (3): 221 - 56.
4. Contesini FJ, da Silva VCF, Maciel RF, de Lima RJ, Barros FFC, Carvalho PD. Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation. *J Microbiol*. 2009 Oct 24; 47 (5): 563 - 571.
5. Colla LM, Rizzardi J, Pinto MH, Reinehr CO, Bertolin TE, Vieira Costa JA. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresour Technol*. 2010 Nov; 101 (21): 8308 - 8314.
6. Burkert JFM, Maugeri F, Rodrigues MI. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresour Technol*. 2004 Jan; 91 (1): 77 - 84.
7. Ertugrul S, Donmez G, Takac S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. From olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *J Hazard Mater*. 2007 Nov 19; 149 (3): 720 - 724.
8. Joseph B, Ramteke PW, Thomas G, Shrivastava N. Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnol Mol Biol Rev*. 2007 ; 2 (2): 39 - 48.
9. Yadav RP, Saxena RK, Gupta R, Davidson S. Lipas production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Folia Microbiol*. 1998; 43 (4): 373 - 378.
10. Vakhlu J, Kour A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Eur J Biotechnol*. 2006; 9 (1): 69 - 81.
11. Kumar SS, Gupta R. An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. *Process Biochem*. 2008; 43 (10): 1054 - 1060.
12. Salihu A, Alam MZ, Abdulkarim MI, Salleh HM. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. *J Mol Catal B: Enzym*. 2011Apr; 69 (1-2): 66 - 73.
13. Liu Z, Chi Z, Wang L, Li J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochem Eng J*. 2008 Jul 1; 40 (3): 445 - 51.
14. Ciafardini G, Zullo BA, Iride A. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiol*. 2006 Feb; 23 (1): 60 - 7.
15. Domínguez A, Costas M, Longo MA, Sanromán A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett*. 2003 Aug; 25 (15): 1225 - 1229.
16. Bussamara R, Fuentefria AM, de Oliveira E, Broetto L, Simcikova M, Valente A, et al. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresour Technol*. 2010 Jan;101 (1): 268 - 275.
17. Pandey A, Soccol RR, Larroche C, editors. Current development in solid-state fermentation. Vol. 4. 2008. Singhania RR, Soccol CR, Pandey A. Application of tropical agro-industrial residues as substrate for solid-state fermentation processes. p. 412 - 442.
18. Manpreet S, Sawraj S, Sachin D, Pankaj S, Banerjee UC. Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian J Microbiol*. 2005; 1 (2): 1 - 9.
19. Mala JGS, Edwinoliver NG, Kamini NR, Puvanakrishnan R. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. *J Gen Appl Microbiol*. 2007 Aug; 53 (4): 247 - 53.

EDITORIAL

INDONESIA GOVERNMENT GRANTED 7 COMPULSORY LICENCES TO PROMOTE ACCES TO HIV RELATED MEDICINES

“Starting with Malaysia in 2003, many Asian countries are now taking action to promote cheaper medicines through compulsory licensing, with Indonesia being the most recent case. Recent government actions by Indonesia and India to issue compulsory licenses –CL– are extending the trend in Asia to increase access to cheaper medicines for treating serious ailments, especially those related to HIV/AIDS, cancer and Hepatitis B” (1). In recent years, a number of countries have issued licenses to improve access to medicines, including, Thailand, Brazil, Malaysia, Zambia, Ecuador and India, among others.

Indonesian President Susilo Bambang Yudhoyono issued a decree on 3rd September 2012 that allows the government to use patents for seven HIV/AIDS and hepatitis B medicines. “We will ensure the availability of good quality, safe and effective generic versions of anti-retroviral and anti-viral drugs,” said HM Subuh, Infectious Disease Control Director at the Indonesian Health Ministry, as quoted in The Jakarta Post on 19th October.

Under World Trade Organization Agreement on Trade-Related Aspects of Intellectual Property (WTO’s TRIPS), WTO members have the right to grant compulsory licenses, in order to promote access to vital medicines. It is not the first time that Indonesia government issued a compulsory licence (known in the Indonesia case as for “government use”) for HIV drugs, the previous decree goes to 2004 and 2007, but the present Indonesia’s decree may represent the broadest single use of CL for pharmaceuticals by a country, since the creation of WTO in 1995.

The decree renews a previous compulsory licence -CL- issued against Merck & Co (US)’s HIV anti-retroviral (ARV) Sustiva (efavirenz) in 2007, and adds six more drugs to the list. Pre-existing 2007 compulsory licenses remain against Boehringer Ingelheim (Germany)’s ARV Viramune (nevirapine) and Shire Pharmaceutical (United Kingdom)’s Hepatitis B treatment lamivudine. These drugs can be now licensed by the Ministry of Health to pharmaceutical companies to exploit patents on behalf of the government, effective until the end of term of each patent, with a 0.5% royalty paid to the patent holder. Summary of Indonesia’s compulsory licenses of 3rd September 2012:

Table 1. Licensed medicines (2).

ACTIVE SUBSTANCE	PATENT HOLDER	PATENT NUMBER	DURATION OF PATENT
Efavirenz	Merck & Co., INC	ID 0005812	Until the end of patent period, August 7 th , 2013
Abacavir	Glaxo Group Limited	ID 0011367	Until the end of patent period, May 14 th , 2018
Didanosine	Bristol - Myers Squibb Company	ID 0010163	Until the end of patent period, August 6 th , 2018
Combination Lopinavir and Ritonavir	Abbott Laboratories	ID 0023461	Until the end of patent period, August 23 rd , 2018
Tenofovir	Gilead Sciences, Inc.	ID 0007658	Until the end of patent period, July 23 rd , 2018
Combination of Tenofovir and Emtricitabine Combination of Tenofovir, Emtricitabine and Evafirenz	Gilead Sciences, Inc.	ID P0029476	Until the end of patent period, 3 rd November 2024

EDITORIAL

EL GOBIERNO DE INDONESIA CONCEDIÓ 7 LICENCIAS OBLIGATORIAS PARA PROMOVER EL ACCESO A MEDICINAS RELACIONADAS CON EL VIH¹

“Comenzando con Malasia en 2003, muchos países asiáticos están tomando acciones ahora para promover medicinas más baratas a través del licenciamiento obligatorio, siendo Indonesia el caso más reciente. Recientes acciones gubernamentales provenientes de Indonesia e India para expedir licencias obligatorias – CL – están extendiendo la tendencia en Asia para incrementar el acceso a medicinas más baratas para el tratamiento de Dolores serios, especialmente aquellos relacionados con el VIH/SIDA, cáncer y Hepatitis B” (1). En años recientes, algunos países han expedido licencias para mejorar el acceso a medicinas, incluyendo, Tailandia, Brasil, Malasia, Zambia, Ecuador e India, entre otros.

El presidente de Indonesia Susilo Bambang Yudhoyono expidió un decreto el 3 de Septiembre de 2012, que habilita al gobierno a usar patentes para siete medicinas de VIH/SIDA y Hepatitis B. “Nosotros garantizaremos la disponibilidad de versiones genéricas de drogas antirretrovirales y antivirales que sean de buena calidad, seguras y efectivas”, dijo HM Subuh, Director del Control de Enfermedades Infecciosas en el Ministerio de Salud de Indonesia, citado en The Jakarta Post el 19 de Octubre.

Bajo el acuerdo de la Organización Mundial de Comercio (OMS) sobre Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual Relacionados con el Comercio (ADPIC), los miembros de la OMS tienen el derecho de otorgar licencias obligatorias, con el objetivo de promover el acceso a medicinas vitales. No es la primera vez que el gobierno de Indonesia expide una licencia obligatoria (conocida en el caso de Indonesia como “de uso gubernamental”) para drogas del VIH; el decreto previo va hasta 2004 y 2007, pero el actual decreto de Indonesia puede representar el más amplio uso sencillo de licencias obligatorias para farmacéuticos por un país, desde la creación de la OMS en 1995.

El decreto renueva una licencia obligatoria previa expedida contra el antirretroviral de VIH (ARV) Sustiva (Efavirenz) de Merck & Co (US) en 2007, y adhiere 6 drogas más a la lista. Licencias obligatorias preexistentes de 2007 permanecen contra el ARV Viramune (nevirapine) de Boehringer Ingelheim (Alemania) y el tratamiento lamivudine para la Hepatitis B de Shire Pharmaceutical (United Kingdom). Esas drogas pueden ser licenciadas ahora por el Ministerio de Salud para que las compañías farmacéuticas exploten patentes en nombre del gobierno, efectivo hasta el fin de término de cada patente, con un pago de 0,5% de regalías al titular de la patente. A continuación, Resumen de las licencias obligatorias de Indonesia del 3 de Septiembre de 2012:

Tabla 1. Medicinas licenciadas (2).

SUSTANCIA ACTIVA	TITULAR DE LA PATENTE	NÚMERO DE LA PATENTE	DURANCIÓN DE LA PATENTE
Efavirenz	Merck & Co., INC	ID 0005812	Hasta el fin del período de la patente, 7 de Agosto de 2013
Abacavir	Glaxo Group Limited	ID 0011367	Hasta el fin del período de la patente, 14 de Mayo de 2018
Didanosine	Bristol - Myers Squibb Company	ID 0010163	Hasta el fin del período de la patente, 6 de Agosto de 2018
Combinación Lopinavir y Ritonavir	Abbott Laboratories	ID 0023461	Hasta el fin del período de la patente, 23 de Agosto de 2018

¹ Traducción: Juan Ignacio del Río Blandón.

Indonesia has set an important precedent, not just for the people living with HIV within its country, who have been campaigning for this, but also for other developing countries, (...) As medicines for HIV and Hepatitis B are increasingly under patent in developing countries, Indonesia has shown that countries can and should take action to enable the production of low-cost versions of essential life-saving medicines for their citizens. The next step is the full implementation of the decree. Other countries that have faced blocking on access to generic medicines should consider following Indonesia's lead", said Michelle Childs of Medecins Sans Frontieres (3).

The International Federation of Pharmaceutical Manufacturers and Associations – IFPMA-, representing global drug manufacturers, expressed concern at the wide-ranging decree. Andrew Jenner, its director of innovation, intellectual property and trade, said developing countries had a right to override patents by issuing so-called compulsory licenses in certain limited circumstances, but this should be a last resort. According to Jenner "Systematic issuance of compulsory licenses by Indonesia sets a negative precedent and can reduce the incentive to invest in the research and development of new medicines, including HIV/AIDS and hepatitis therapies (...) We believe that negotiated approaches, such as tiered pricing or voluntary licensing, are generally more effective and sustainable, both medically and economically." These views and approach of IFPM to use the negotiations, voluntary licenses and corporate social responsibility have been also recently supported and promoted by the World Health Organization -WHO (4).

According to MSF (5), the Presidential decree, if fully implemented, will allow local generic production of the medicines (which will open up competition, and could significantly reduce prices) while each of the innovator companies will be paid a royalty of half a percent. There are 310,000 people living with HIV in Indonesia.

As Brook Baker said "It is a tremendous victory for people living with HIV in Indonesia that it has issued new compulsory licenses on seven anti-retroviral medicines, allowing the government to access generic versions of those medicines – domestically or by importation – at much cheaper prices. Indonesia now stands at the head of the pack of countries that have stood up to Big Pharma's corporation power and to the trade and diplomatic pressure exerted by US and EU powers that consistently advance the IP monopoly rights of pharmaceutical multinationals" (6).

The Indonesian Presidential decree is an effort to expand access to newer and more appropriate antiretroviral treatments and as stated by Public Citizen Organization, "Indonesia's action sets a powerful example for other countries and a critical precedent for global public health."

Germán Velásquez Ph.D.

Special Adviser for Health and Development at the South Centre, Geneva

December 2012

REFERENCES

1. Khor M. Measure to make drugs affordable. Global Trends. The Star on line. 2012 Oct 22.
2. Public Citizen. Actions in Indonesia [internet]. Disponible en: <http://www.citizen.org/actions-indonesia>
3. MSF responds to Indonesia's intent to issue compulsory licenses on 7 HIV drugs. Geneva; 2012 Oct 12.
4. Beyer P. Socially responsible licensing policies in the medical sector. PTT presentation at the WTO Workshop on IP & public health. Geneva; 2012 Oct. p. 9 – 12.
5. MSF responds to Indonesia's intent to issue compulsory licenses on 7 HIV drugs. Geneva; 2012 Oct. 12.
6. Baker B. Indonesian Compulsory Licenses Show Values of Pro-Access TRIPS-Flexibility Terms in Voluntary Licenses [internet]. 2012 Oct 30. Disponible en: <http://infojustice.org/archives/27620>

SUSTANCIA ACTIVA	TITULAR DE LA PATENTE	NÚMERO DE LA PATENTE	DURANCIÓN DE LA PATENTE
Tenofovir	Gilead Sciences, Inc.	ID 0007658	Hasta el fin del período de la patente, Julio 23 de 2018
Combinación de Tenofovir y Emtricitabine Combinación de Tenofovir, Emtricitabine y Evafirenz	Gilead Sciences, Inc.	ID P0029476	Hasta el fin del período de la patente, 3 de Noviembre de 2024

Indonesia ha establecido un importante precedente, no sólo para la gente que vive con VIH dentro de su país, quien ha venido batallando con esto, sino para otros países en desarrollo, (...) Mientras que las medicinas para VIH y Hepatitis B se están incrementando bajo patentes en países en desarrollo, Indonesia ha demostrado que los países pueden y deben tomar acciones para permitir la producción de versiones de bajo costo de medicinas salva-vidas, esenciales para sus ciudadanos. El próximo paso es la completa implementación del decreto. Otros países, que han enfrentado bloqueos en el acceso a medicinas genéricas, deberían considerar el seguir el ejemplo de Indonesia”, dijo Michelle Childs de Médicos Sin Fronteras (Medecins Sans Frontieres –MSF) (3).

La Federación Internacional de Productores de Farmacéuticos y Asociaciones –IFPMA–, representando a los productores globales de drogas, expresó preocupación por el gran alcance del decreto. Andrew Jenner, su director de innovación, propiedad intelectual y comercio, dijo que los países en desarrollo tenían derecho de invalidar patentes expidiendo las así llamadas licencias obligatorias en determinadas circunstancias, pero esto debe ser un último recurso. De acuerdo con Jenner “La expedición sistemática de licencias obligatorias por parte de Indonesia establece un precedente negativo y puede reducir la iniciativa de invertir en la investigación y desarrollo de nuevas medicinas, incluyendo VIH/SIDA y terapias de Hepatitis (...) Creemos que enfoques de negociación, tales como, precios diferenciados o licenciamiento voluntario, son en general más efectivos y sostenibles, tanto en lo médico como en lo económico. Estos puntos de vista y enfoques de IFPM en usar negociaciones, licencias voluntarias y responsabilidad social corporativa han sido también apoyados y promovidos recientemente por la Organización Mundial de la Salud –OMS (4).

De acuerdo con MSF (5), el decreto presidencial, si se implementa completamente, permitirá la producción local de medicamentos genéricos (lo cual traerá competencia, y puede reducir significativamente los precios) mientras que a cada una de las compañías innovadoras se les pagará la mitad de porcentaje de regalías. Hay 310.000 personas viviendo con VIH en Indonesia.

Como dijo Brook Baker “Es una victoria tremenda para la gente que vive con VIH en Indonesia que se haya expedido nuevas licencias obligatorias en siete medicinas antirretrovirales, permitiendo al gobierno acceder a versiones genéricas de esas medicinas (nacional o por importación) a un precio mucho más barato. Indonesia encabeza ahora la lista de países que se han revelado al poder de las grandes compañías farmacéuticas, y a la presión diplomática y del comercio ejercida por poderes de EU y UE que consistentemente avanzan el monopolio de los derechos de PI de las multinacionales farmacéuticas” (6).

El decreto presidencial de Indonesia es un esfuerzo de expandir el acceso a nuevos y más apropiados tratamientos antirretrovirales, y como fue dicho por la Organización Pública del Ciudadano, “La acción de Indonesia establece un poderoso ejemplo para otros países, así como un crítico precedente para la salud pública global”.

Germán Velásquez Ph.D.

Special Adviser for Health and Development at the South Centre, Geneva

Diciembre 2012

PARÁMETROS CINÉTICOS Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS TERMOTOLERANTES CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

KINETICS PARAMETERS AND SHORT CHAIN FATTY ACIDS PROFILE OF THERMOTOLERANT LACTIC ACID BACTERIA WITH DIFFERENT CARBON SOURCES

Juan DÍAZ-VELA M.Sc.¹, Lino MAYORGA-REYES Ph.D.², Alfonso TOTOSAUS S. Ph.D.³,
María de Lourdes PÉREZ-CHABELA Ph.D.^{1*}

Recibido: Septiembre 17 de 2012 Aceptado: Diciembre 17 de 2012

RESUMEN

Antecedentes: Los prebióticos son sustancias obtenidas de fuentes vegetales, las cuales son digeribles en el colon donde se sitúa el mayor número de flora intestinal. Las inulinas de achicoria y agave son utilizadas como prebióticos en distintos alimentos, proporcionando beneficios al aumentar la flora microbiana benéfica. **Objetivos:** Determinar el efecto de diferentes fuentes de carbono como inulina de agave, achicoria, y albedo de naranja sobre los parámetros cinéticos y el perfil de ácidos grasos de cadena corta de dos bacterias ácido lácticas, a saber: *P. pentosaceus* y *A. viridans*. **Métodos:** Se realizó el análisis químico proximal (humedad, proteína, pH, cenizas, extracto etéreo y fibra total) del albedo de naranja (AN), inulina de agave (IA) e inulina de achicoria (ICh). Se realizó fermentaciones de 12 h con las bacterias ácido lácticas, utilizando inulina de achicoria (ICh), de agave (IA), y albedo de naranja (AN) como fuente de carbono en concentraciones de 0,5, 1,0 ó 1,5% (p/v), utilizando glucosa como testigo. La producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se realizó mediante la técnica de HPLC (ácido láctico) y cromatografía de gases (ácido acético, propiónico y butírico). Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la diferencia entre medias se llevó a cabo mediante un análisis de medias de Tukey ($\alpha = 0,05$). **Resultados:** El AN presentó un porcentaje significativamente ($P < 0,05$) mayor de humedad, cenizas, extracto etéreo y fibra total; mientras que IA tuvo mayor porcentaje de proteína y un pH más alto ($P < 0,05$). Para ambas bacterias, el mayor crecimiento fue con ICh al 1,0% ($P < 0,05$), siendo el ácido láctico el metabolito de mayor producción. Con AN al 1,0%, las dos cepas mostraron un menor tiempo de duplicación, además de una mayor producción de ácido láctico, acético y butírico ($P < 0,05$). **Conclusiones:** Con la utilización de AN, a las actuales condiciones experimentales, se obtuvo menores tiempos de generación en comparación con las inulinas, y una mayor producción de ácidos orgánicos, por lo que concluimos que el AN puede ser considerado como un prebiótico potencial.

Palabras clave: Prebióticos, inulina, fermentación, análisis proximal, bacterias ácido lácticas.

¹ Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México D. F.

² Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana. Xochimilco, México D. F.

³ Laboratorio de Ciencia de los Alimentos. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. México.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: lpch@xanum.uam.mx

ABSTRACT

Background: Prebiotics are substances obtained from vegetable sources which are digestible in the colon where is situated most of the intestinal flora. The chicory inulin and agave are used as prebiotics in different foods, providing benefits by increasing the beneficial microbial flora. **Objectives:** The aim of this study was to determine the effect of different carbon sources, such as inulin from agave, chicory, or orange albedo on the kinetic parameters and the profile of short chain fatty acids of lactic acid bacteria. **Methods:** Proximate analysis (moisture, protein, pH, ash, ether extract and total fiber) of orange albedo, agave inulin and chicory inulin was performed. Fermentation batches (12 h) were performed with two lactic acid bacteria, *P. pentosaceus* and *A. viridans*, employing chicory (CI), agave inulin (AI), and orange albedo (OA) as carbon source at different concentrations of 0.5, 1.0 and 1.5% (w/v), against glucose as control. The production of short chain fatty acids (SCFA) was performed using the HPLC technique (lactic acid) and gas chromatography (acetic, propionic and butyric acids). The results were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and the difference between means was performed using a Tukey means analysis ($\alpha = 0.05$). **Results:** OA showed a significantly ($P < 0.05$) higher moisture, ash, ether extract and total fiber, while AI had the highest percentage of protein and a higher pH ($P < 0.05$). For both strains, maximum growth was observed with 1.0% CI ($P < 0.05$), being lactic acid the major metabolite produced. With 1.0% OA, both strains showed shorter duplication time, and a higher lactic, acetic and butyric acids production ($P < 0.05$). **Conclusions:** By using OA, in the present experimental conditions, were obtained lower generation times compared with inulins, and increased production of organic acids, from which we conclude that the OA may be regarded as a potential prebiotic.

Keywords: Prebiotic, inulin, fermentation, proximate analysis, lactic acid bacteria.

INTRODUCCIÓN

Los prebióticos han sido definidos como ingredientes alimenticios no-digeribles que afectan benéficamente al huésped por estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, generando beneficios a la salud (1). Recientemente han redefinido el concepto de prebiótico como un ingrediente fermentable selectivo que permite cambios específicos, además de conferir beneficios sobre la composición y/o actividad de la microflora gastrointestinal (2). Los ingredientes prebióticos se consideran además como parte de aquellos alimentos funcionales que pueden modificar de manera positiva los procesos fisiológicos y biológicos en la nutrición, o como auxiliares en el tratamiento de enfermedades humanas (3). Los prebióticos deberán ser fermentados únicamente por bacterias del colon, promoviendo algunas funciones fisiológicas específicas a través de la liberación de metabolitos por las bacterias, en especial los ácidos grasos de cadena corta al lumen intestinal (4). Las bacterias del colon presentan diferentes grados de fermentación, dependiendo de los carbohidratos que vayan a metabolizar, donde aquellos carbohidratos con un bajo nivel de polimerización son metabolizados de una forma

más efectiva, aun por encima de azúcares como la glucosa. Durante la fermentación de ingredientes los prebióticos por parte de los probióticos en el colon mejoran la producción de ácidos grasos de cadena corta como butírico, acético y propiónico, los cuales son rápidamente absorbidos. El butirato es la mayor fuente de energía para los colonocitos, el propionato es mayormente absorbido por el hígado, y el acetato entra en periférica para ser metabolizado por tejidos periféricos. Estos ácidos grasos de cadena corta pueden reducir el riesgo de desarrollar desórdenes gastrointestinales, cáncer y enfermedades cardiovasculares (5).

Dentro de los ingredientes prebióticos, la inulina ha sido una de las más utilizadas por su resistencia al proceso digestivo, además de ser considerada como fibra dietética y por ser un compuesto que mediante estudios *in-vitro* e *in-vivo* resulta efectivo sobre el crecimiento de la microflora intestinal, disminuyendo microorganismos patógenos como clostridium, donde en algunos tratamientos se incrementó la relación de butirato, indicando un cambio en la actividad bacteriana (6). Por otro lado, el albedo es un tejido alto en fibra que se encuentra en diversas frutas cítricas, es de color blanco y esponjoso localizado en la cáscara. Este material puede ser considerado como ingrediente

funcional debido al contenido de fibra, además de ser una buena fuente de oligosacáridos pécticos con actividad prebiótica (7).

El objetivo general de este trabajo fue determinar el efecto de diferentes fuentes de carbono como inulina de agave, achicoria y albedo de naranja sobre los parámetros cinéticos y el perfil de ácidos grasos de cadena corta de dos bacterias ácido lácticas, *P. pentosaceus* y *A. viridans*. Los objetivos específicos fueron: determinar el análisis químico proximal del AN, IA e ICh; cuantificar el crecimiento viable de las bacterias en estudio con las diferentes fuentes y concentraciones de carbono; y, cuantificar la producción de ácidos grasos de cadena corta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

La inulina de achicoria (*Cichorium intybus* L.) e inulina de agave (*Agave* spp.) fueron obtenidas a partir de Nano Nutrition S.R.L. de C.V. (Naucalpan, México). El albedo de naranja fue obtenido de acuerdo a la metodología reportada por Durán *et al.*, 2008 (8). El albedo (parte blanca y esponjosa) fue retirado manualmente de las cascara de naranja (*Citrus sinensis*), eliminando la limonina con una solución de NaCl al 15% a 95°C por 30 min. Posteriormente, fue secado en una estufa a 60 °C durante 24 h, después fue molido en un molino manual, fue tamizado con una malla No. 80 y fue almacenado al vacío a temperatura ambiente hasta su análisis y utilización.

Análisis proximal

Se determinó la humedad (Método Oficial 925.40), proteína total (Método Oficial 960.52), pH (Método Oficial 994.18), cenizas (Método Oficial 940.18), extracto etéreo como grasa total (920.26) y fibra total (Método Oficial 991.43), de la AOAC, a las muestras de albedo de naranja, inulina de agave e inulina de achicoria (9).

Preparación del inóculo

Las cepas utilizadas, *Pediococcus pentosaceus* y *Aerococcus viridans*, previamente identificadas como bacterias lácticas termotolerantes y probióticas, fueron reactivadas en caldo MRS, incubando a 37°C durante 12 h (10, 11). Después de este paso, se realizó la adaptación de las bacterias en medio de cultivo tripticasa de soya, peptona y extracto de

levadura (TPY, por las siglas en inglés de Trypticase-Peptone-Yeast), incubando a 37°C durante 12 h a pH 6,5 (12). El inóculo se preparó al transferir a medio TPY una alícuota (2 mL) de los tubos de bacterias activadas, incubando a 37°C durante 12 h a 200 rpm.

Cinética del crecimiento y pH

Las fermentaciones fueron realizadas de acuerdo a la metodología propuesta por Bustamante *et al.*, 2006 (13), utilizando medio TPY suplementando con 0,5, 1,0 y 1,5 % (p/v) de albedo de naranja, inulina de agave, inulina de achicoria y glucosa (testigo), como fuentes de carbono. Se inoculó aproximadamente 3 log₁₀ UFC/mL en matraces de fermentación a una temperatura de 37°C y una agitación de 200 rpm. Se tomó alícuotas (2 mL) a partir del tiempo cero hasta completar 12 h de fermentación con intervalos de una hora para la determinación del crecimiento bacteriano (conteo en placa de agar TPY incubadas a 37°C durante 24 h, reportando UFC/mL) y pH. Se calculó la tasa específica de crecimiento “*k*” y tiempo de duplicación “*g*” (como el inverso de “*k*”) como medidas de la capacidad de adaptación de las bacterias a las diferentes fuentes de carbono, de acuerdo a la ecuación 1 (14):

$$k = \frac{\text{Log } N_t - \text{Log } N_0}{\text{Log } 2t} \quad \text{Ecuación 1.}$$

dónde: N_t = número final de células (UFC/mL); N_0 = número inicial de células (UFC/mL); t = tiempo de fermentación (h).

Producción de ácidos grasos de cadena corta

Para la determinación de ácidos grasos de cadena corta, se tomó alícuotas de 2 mL a los tiempos 0, 6 y 12 h de fermentación. El análisis se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Manderson *et al.*, 2005 (15), con algunas modificaciones. Para el análisis del ácido láctico se utilizó cromatografía de líquidos HPLC modelo 250 (Perkin Elmer, Norwalk) en una columna Resex Organic Acids (7.8 x 300 mm), detector de índice de refracción, y ácido sulfúrico (0.5 mN) como fase móvil a un flujo isocrático de 0.6 mL/min y una temperatura de 50°C. El análisis de ácido acético, propiónico y butírico se llevó a cabo mediante cromatografía de gases HP 5890 Series II (Perkin Elmer, Shelton) utilizando una columna AT-1000 (10 m x 0.250 mm), detector de ionización de

flama, N₂ como gas de arrastre, un flujo de 1 mL/min y una rampa de temperatura (90-120°C @ 5°/min).

Análisis estadístico

Para el análisis del efecto de los tratamientos utilizados se aplicó un diseño factorial completo de dos factores: fuente de carbono (albedo de naranja, inulina de agave e inulina de achicoria) y la concentración de éstos como fuente alternativa de carbono (0,5, 1,0 y 1,5 %). Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa SPSS Versión 15 para Windows®. La diferencia entre medias en la determinación de los parámetros fisicoquímicos se llevó a cabo mediante un análisis de medias de Tukey ($\alpha = 0,05$) con el mismo paquete estadístico.

RESULTADOS

Análisis proximal

La Tabla 1 muestra los resultados del análisis proximal y microbiológico para albedo de naranja, inulina de agave e inulina de achicoria. El albedo de naranja tuvo mayor contenido de humedad que las inulinas. Las diferentes condiciones de temperatura, de tiempo de secado, y las diferencias intrínsecas de la materia prima influyeron directamente sobre la liberación del agua, provocando en algunos casos el efecto de endurecimiento de los residuos impidiendo la liberación óptima de agua (16). Con respecto al pH de las muestras, el valor más bajo ($P < 0,05$) se obtuvo con albedo de naranja, debido probablemente al contenido de ácidos orgánicos en cítricos (17). El contenido de cenizas más bajo ($P < 0,05$) se observó en inulina de agave (0,15 %), mientras que el albedo de naranja tuvo el mayor porcentaje (4,99 %). El contenido de cenizas está relacionado con la concentración de calcio en albedo de naranja, donde el calcio varía de acuerdo al estado de madurez de este tipo de frutos cítricos (18). Respecto al extracto etéreo, el albedo de naranja tuvo valores mayores ($P < 0,05$) que las inulinas, debido probablemente a la presencia de ceras epicuticulares de la cáscara en este tipo de frutos cítricos (19). El contenido de proteína fue mayor para la inulina de agave y menor para el albedo de naranja con valores de 1,02 y 0,58 %, respectivamente.

Tabla 1. Análisis químico proximal del albedo de naranja, inulina de agave e inulina de achicoria.

	Albedo de naranja	Inulina de agave	Inulina de achicoria
Humedad (%)	4,72 ± 0,42 ^a	3,66 ± 0,34 ^b	3,78 ± 0,12 ^b
Proteína (%)	0,58 ± 0,03 ^c	1,02 ± 0,07 ^a	0,87 ± 0,08 ^b
pH	4,28 ± 0,19 ^c	6,44 ± 0,65 ^a	5,13 ± 0,25 ^b
Cenizas (%)	4,99 ± 0,46 ^a	0,15 ± 0,02 ^c	0,61 ± 0,05 ^b
Extracto etéreo (%)	2,12 ± 0,20 ^a	1,96 ± 0,11 ^c	1,33 ± 0,12 ^b
Fibra dietética total (%)	55,72 ± 2,96 ^a	33,16 ± 2,26 ^b	31,19 ± 1,53 ^b

^{a,b,c} Medias con la misma letra en el mismo renglón no son significativamente ($P > 0,05$) diferentes.

Cinética del crecimiento

La capacidad de adaptación al medio de cultivo por parte de las bacterias analizadas se vio reflejada en los parámetros de velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación. La Tabla 2 muestra los resultados para *P. pentosaceus* con los diferentes tipos y concentraciones de fuentes de carbono. La velocidad específica de crecimiento fue significativamente mayor ($P < 0,05$) al utilizar albedo de naranja e inulina de achicoria a concentraciones de 0,5 y 1,5%. De este modo, los tiempos de duplicación fueron significativamente ($P < 0,05$) menores para estos sustratos. Al comparar con la glucosa a una concentración del 1,0%, el albedo de naranja tuvo valores significativamente ($P < 0,05$) mayores de crecimiento (1,46 h⁻¹), seguido de inulina de agave (1,29 h⁻¹), y con valores de duplicación menores (0,69 – 0,78 h) que con glucosa o inulina de achicoria (0,91 – 0,92 h). Los valores de la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación fueron significativamente ($P < 0,05$) mayores al 1,0% de fuente de carbono.

Tabla 2. Velocidad específica de crecimiento (*k*) y tiempo de duplicación (*g*) para *P. pentosaceus* empleando diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono	Concentración (% p/v)					
	0,5		1,0		1,5	
	<i>k</i> (h ⁻¹)	<i>g</i> (h)	<i>k</i> (h ⁻¹)	<i>g</i> (h)	<i>k</i> (h ⁻¹)	<i>g</i> (h)
Glucosa	-	-	1,10 ^c	0,91 ^a	-	-
Albedo de naranja	1,24 ^{a,B}	0,81 ^{b,C}	1,45 ^{a,A}	0,69 ^{c,D}	1,17 ^{ab,B}	0,85 ^{ab,C}
Inulina de agave	1,26 ^{a,A}	0,80 ^{b,C}	1,29 ^{b,A}	0,78 ^{b,C}	1,22 ^{a,A}	0,82 ^{b,C}
Inulina de achicoria	1,11 ^{b,A}	0,90 ^{a,C}	1,09 ^{c,A}	0,92 ^{a,C}	1,13 ^{b,A}	0,88 ^{a,C}

^{a,b,c} Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($P > 0,05$) diferentes para la velocidad específica de crecimiento (*k*) y tiempo de duplicación (*g*).

^{A,B} Medias con la misma letra en la misma fila no son significativamente ($P > 0,05$) diferentes para la velocidad específica de crecimiento (*k*) para las diferentes concentraciones de las fuentes de carbono.

^{C,D} Medias con la misma letra en la misma fila no son significativamente ($P > 0,05$) diferentes para el tiempo de duplicación (*g*) para las diferentes concentraciones de las fuentes de carbono.

La Tabla 3 muestra los resultados de parámetros de crecimiento para *A. viridans*. A concentraciones de 0,5 % de fuente de carbono no hay diferencia significativa ($P > 0,05$), y a concentraciones de 1,5% los valores de g fueron significativamente ($P < 0,05$) mayores para inulina de achicoria en comparación con inulina de agave y albedo de naranja. Al utilizar el 1,0% del albedo de naranja e inulina de achicoria se obtuvo valores significativamente ($P < 0,05$) mayores de g (1,44 y 1,40 h⁻¹, respectivamente), y por lo tanto, valores significativamente ($P < 0,05$) menores de tiempo de duplicación (0,70 h). Los valores de la tasa específica de crecimiento y de tiempo de duplicación fueron significativamente ($P < 0,05$) mayores al 1,0% de fuente de carbono.

Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento (k) y tiempo de duplicación (g) para *A. viridans* empleando diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono	Concentración (% p/v)					
	0,5		1,0		1,5	
	k (h ⁻¹)	g (h)	k (h ⁻¹)	g (h)	k (h ⁻¹)	g (h)
Glucosa	-	-	1,10 ^c	0,91 ^a	-	-
Albedo de naranja	1,26 ^{a,A}	0,79 ^{a,C}	1,25 ^{b,B}	0,80 ^{b,C}	1,23 ^{ab,A}	0,81 ^{b,C}
Inulina de agave	1,36 ^{a,A}	0,73 ^{a,C}	1,44 ^{a,A}	0,69 ^{c,D}	1,37 ^{a,A}	0,73 ^{b,C}
Inulina de achicoria	1,24 ^{a,B}	0,80 ^{a,D}	1,40 ^{a,A}	0,71 ^{c,D}	1,06 ^{b,C}	0,95 ^{a,C}

^{a,b,c} Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($P > 0,05$) diferentes para la velocidad específica de crecimiento (k) y tiempo de duplicación (g).

^{A,B} Medias con la misma letra en la misma fila no son significativamente ($P > 0,05$) diferentes para la velocidad específica de crecimiento (k) para las diferentes concentraciones de las fuentes de carbono.

^{C,D} Medias con la misma letra en la misma fila no son significativamente ($P > 0,05$) diferentes para el tiempo de duplicación (g) para las diferentes concentraciones de las fuentes de carbono.

La Figura 1 muestra las curvas de crecimiento celular y pH de las bacterias lácticas utilizadas para las diferentes fuentes de carbono al 1%. En general, se observó diferencias en las curvas de crecimiento y disminución del pH para ambos microorganismos al cambiar la fuente de carbono. El acortamiento de las fases de adaptación al utilizar otras fuentes de carbono diferentes a la glucosa da cuenta de la degradación de los compuestos disponibles en albedo de naranja, inulina de agave e inulina de achicoria para *P. pentosaceus* y *A. viridans*.

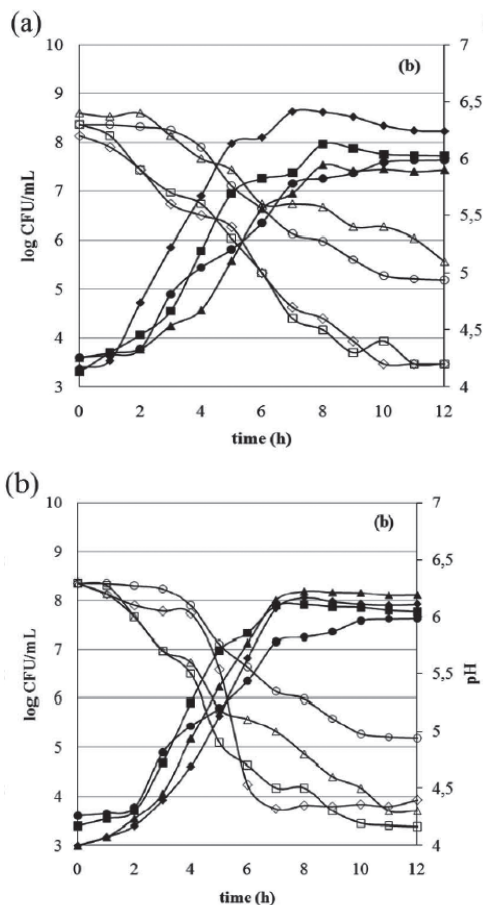


Figura 1. Cinéticas de crecimiento y descenso de pH para (a) *P. pentosaceus* y (b) *A. viridans* empleando diferentes fuentes de carbono: (●) glucosa, (■) inulina de agave, (▲) inulina de achicoria, y (◆) albedo de naranja (pH en símbolos blancos).

Producción de ácidos grasos de cadena corta

En la Tabla 4 se observa la producción de ácidos orgánicos de cadena corta para *P. pentosaceus* con las diferentes fuentes de carbono al 1%. Al inicio de la fermentación la producción de ácido láctico fue significativamente ($P < 0,05$) mayor con glucosa como sustrato que con el resto de los ingredientes prebióticos. Este comportamiento fue similar a las 6 y 12 h de fermentación. La menor cantidad de ácido láctico producida por las diferentes fuentes de carbono utilizadas fue con las inulinas. En los ácidos grasos de cadena corta, al inicio de la fermentación el utilizar albedo de naranja resultó en valores significativamente mayores ($P < 0,05$) que con el resto de los ingredientes prebióticos o glucosa, comportamiento que se observó a las 6 y 12 h de fermentación. La producción de ácido propiónico fue significativamente mayor ($P < 0,05$) con glucosa que con los ingredientes

prebióticos durante los intervalos de muestreo de la fermentación. Finalmente, para el ácido butírico la fermentación de inulina de achicoria tuvo valores significativamente mayores ($P < 0,05$) al inicio y a las 6 y 12 h, en comparación con el resto de ingredientes prebióticos o glucosa.

Tabla 4. Producción de ácidos grasos de cadena corta para *P. pentosaceus* con las diferentes fuentes de carbono al 1% (p/v).

Tiempo (h)	Fuente de carbono	Concentración (g/L)			
		C ₃ H ₆ O ₃	C ₂ H ₂ O ₂	C ₃ H ₆ O ₂	C ₄ H ₈ O ₂
0	Glucosa	0,900 ^a	0,652 ^b	0,141 ^a	0,013 ^c
	Inulina de agave	0,003 ^c	0,524 ^c	0,113 ^b	0,023 ^b
	Inulina de achicoria	0,002 ^c	0,648 ^b	0,125 ^b	0,045 ^a
	Albedo de naranja	0,007 ^b	1,002 ^a	0,010 ^c	0,009 ^c
6	Glucosa	3,330 ^d	0,740 ^f	0,232 ^d	0,052 ^d
	Inulina de agave	2,858 ^e	0,738 ^f	0,217 ^d	0,030 ^e
	Inulina de achicoria	1,563 ^f	0,815 ^e	0,182 ^e	0,057 ^d
	Albedo de naranja	1,246 ^g	1,012 ^d	0,013 ^f	0,024 ^f
12	Glucosa	4,280 ^A	0,747 ^C	0,257 ^A	0,056 ^C
	Inulina de agave	2,273 ^C	0,815 ^B	0,230 ^B	0,036 ^D
	Inulina de achicoria	2,271 ^C	0,897 ^A	0,227 ^B	0,084 ^A
	Albedo de naranja	3,680 ^B	1,120 ^D	0,026 ^C	0,069 ^B

Ácidos: láctico (C₃H₆O₃), acético (C₂H₂O₂), propiónico (C₃H₆O₂) y butírico (C₄H₈O₂).

^{a,b,c} Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($P > 0,05$) diferentes para cada ácido graso de cadena corta al tiempo de fermentación 0 h con las diferentes fuentes de carbono.

^{d,e,f,g} Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($P > 0,05$) diferentes para cada ácido graso de cadena corta al tiempo de fermentación 6 h con las diferentes fuentes de carbono.

^{A,B,C,D} Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($P > 0,05$) diferentes para cada ácido graso de cadena corta al tiempo de fermentación 12 h con las diferentes fuentes de carbono.

En la Tabla 5 se presenta los resultados de la producción de ácidos orgánicos de cadena corta para las fermentaciones de *A. viridans* con las diferentes fuentes de carbono al 1%. Para este microorganismo, la producción de ácido láctico fue significativamente mayor ($P < 0,05$) al utilizar inulina de achicoria al inicio, 6 y 12 h de fermentación. La producción de ácido acético fue significativamente mayor ($P < 0,05$) con glucosa durante toda la fermentación que con las otras fuentes de carbono. La

producción de ácido láctico y ácido propiónico fue significativamente mayor ($P < 0,05$) durante toda la fermentación con inulina de achicoria. Las inulinas de achicoria y agave tuvieron un mayor efecto en la producción de ácido propiónico y butírico.

Tabla 5. Determinación de ácidos grasos de cadena corta para *A. viridans* con las diferentes fuentes de carbono al 1% (p/v).

Tiempo (h)	Fuente de carbono	Concentración (g/L)			
		C ₃ H ₆ O ₃	C ₂ H ₂ O ₂	C ₃ H ₆ O ₂	C ₄ H ₈ O ₂
0	Glucosa	0,013 ^{bc}	1,932 ^a	0,605 ^b	0,073 ^c
	Inulina de agave	0,023 ^b	0,084 ^b	0,677 ^a	0,241 ^a
	Inulina de achicoria	0,045 ^a	0,035 ^c	0,530 ^b	0,161 ^b
	Albedo de naranja	0,009 ^c	0,001 ^d	0,671 ^a	0,026 ^d
6	Glucosa	0,013 ^g	1,932 ^e	0,605 ^f	0,073 ^g
	Inulina de agave	0,023 ^f	0,084 ^f	0,677 ^e	0,241 ^e
	Inulina de achicoria	0,045 ^e	0,035 ^g	0,530 ^g	0,161 ^f
	Albedo de naranja	0,009 ^h	0,001 ^h	0,671 ^e	0,026 ^h
12	Glucosa	0,056 ^C	4,315 ^A	0,631 ^D	0,163 ^C
	Inulina de agave	0,036 ^D	3,331 ^B	0,998 ^A	0,304 ^A
	Inulina de achicoria	0,084 ^A	1,936 ^C	0,713 ^C	0,229 ^B
	Albedo de naranja	0,069 ^B	1,837 ^C	0,809 ^B	0,117 ^C

Ácidos: láctico (C₃H₆O₃), acético (C₂H₂O₂), propiónico (C₃H₆O₂) y butírico (C₄H₈O₂).

^{a,b,c} Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($P > 0,05$) diferentes para cada ácido graso de cadena corta al tiempo de fermentación 0 h con las diferentes fuentes de carbono.

^{d,e,f,g} Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($P > 0,05$) diferentes para cada ácido graso de cadena corta al tiempo de fermentación 6 h con las diferentes fuentes de carbono.

^{A,B,C,D} Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($P > 0,05$) diferentes para cada ácido graso de cadena corta al tiempo de fermentación 12 h con las diferentes fuentes de carbono.

DISCUSIÓN

El contenido de proteína pudo deberse a la naturaleza de las muestras, su estado de maduración y al contenido de glucoproteínas presentes en la pared celular primaria donde éstas forman estructuras con la celulosa (20). El mayor contenido de fibra total ($P < 0,05$) se presentó con el albedo de naranja a 55,72%, resultado que se da probablemente por la presencia de celulosa, hemicelulosa y lignina en la composición de la naranja, siendo estos compuestos una fuente de fibra insoluble (21).

La tendencia de las curvas de crecimiento muestran una fase exponencial prolongada, sin transiciones que indiquen un crecimiento diáxico o poliáxico, lo que indica la continuidad en el consumo de sustrato para la producción de biomasa (22); además, una fase de inducción para el consumo de estos sustratos no es necesaria, por lo que son igual de buenos que la glucosa para soportar el crecimiento (23). La corta duración de la fase de adaptación con inulina y albedo de naranja refleja una óptima adaptación al medio de cultivo tanto con *P. pentosaceus* como con *A. viridans*, resaltando una diferencia entre ambas cepas respecto a la velocidad de crecimiento y número de células viables durante el experimento, lo cual se relaciona con lo reportado por Kaplan *et al.*, 2000 (23), donde muestran que existe diferencia de crecimiento bacteriano entre diferentes cepas (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) al utilizar fructooligosacáridos como fuente de carbono. Los valores mayores para k y g al cambiar la fuente de carbono corroboran la capacidad fermentativa de fructooligosacáridos y/o pectinas por estas bacterias lácticas. Stewart *et al.*, 2008 (28), reportaron una rápida fermentación de fructooligosacáridos comparados con inulina de achicoria, siendo importante el grado de polimerización de la fuente de carbono durante el crecimiento de las bacterias. La composición de la fuente de carbono tiene efecto marcado sobre la acidificación (disminución de pH por la producción de ácidos orgánicos volátiles y ácido láctico) y el crecimiento de probióticos (bifidobacterias o lactobacilos), donde el metabolismo fermentativo es más rápido con oligofruetosacáridos que con inulinas, ya que éstas últimas al tener una mayor grado de polimerización tienen un prolongado efecto bifidogénico o prebiótico (24). Se ha reportado efectos positivos con relación al crecimiento de bacterias lácticas usando fuentes alternas de carbono, mostrando tasas específicas de crecimiento similares que con glucosa (25). En este estudio se observó un mejor crecimiento con fuentes alternas de carbono a la glucosa; sin embargo, algunos estudios han reportado un crecimiento más lento con componentes prebióticos, en relación con las hexosas, pero con una biomasa final similar; lo cual bajo las condiciones experimentales usadas en este estudio demuestra un óptimo aprovechamiento de los carbohidratos en el AN o las inulinas (26). Las diferencias en la velocidad de crecimiento entre las diferentes cepas utilizadas puede atribuirse a las

preferencias individuales por una fuente de carbono monomérica (glucosa) en lugar de carbohidratos oligoméricos (27). El albedo de naranja contiene una diversidad de carbohidratos en su composición, siendo los azúcares reductores, fibra dietética soluble (21%) y fibra dietética insoluble (79%) los aprovechables por las bacterias (28). Ghoddsi *et al.*, 2007 (29), reportaron un mejor crecimiento de bacterias lácticas al tener una combinación de carbohidratos como fuente de carbono en el medio de cultivo, en comparación con aquellas fermentaciones donde sólo usaban inulina u otros carbohidratos por separado, lo cual está relacionado con lo que se obtuvo en este experimento al considerar al albedo de naranja como un compuesto no purificado con diversos carbohidratos en su composición.

La adaptación a un medio pobre en monosacáridos confiere un metabolismo altamente adaptable a consumir oligo o polisacáridos, dando una ventaja competitiva a cierto tipo de bacterias, además de afectar fuertemente los productos de la fermentación, sobre todo en la producción de ácidos grasos de cadena corta (22). La producción de ácidos grasos de cadena corta varía tanto en cantidad como en tipo de ácido graso de cadena corta, lo cual está en función del tipo de cepa y fuente de carbono utilizada (30). Un incremento en la población microbiana con fuentes de carbono alternas a la glucosa supone un incremento en la producción de metabolitos (32) como lo son el ácido láctico, acético propiónico y butírico (31, 33).

CONCLUSIONES

Las tres fuentes de carbono utilizadas son una buena fuente de fibra, siendo mayor el porcentaje con albedo de naranja. Las bacterias lácticas presentaron un mayor crecimiento y una menor fase de adaptación cuando se utilizó albedo de naranja en comparación con las dos inulinas, siendo estas últimas consideradas como prebióticos. Se concluye que el albedo de naranja presentó mejores propiedades que las dos inulinas utilizadas, por lo que se considera su uso como prebiótico potencial.

AGRADECIMIENTOS

Juan Díaz Vela agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México, por el otorgamiento de la beca No. 224727 para sus estudios de posgrado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995 Jun; 125 (6): 1401 - 1412.
- Gibson GR, Probert HM, Van Loo JA, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev.* 2004 Dec; 17 (2): 259 -275.
- Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault M, Cummings JH, Frank A, Gibson GR, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr.* 1998 Aug; 80 (1): 147 - 171.
- Cummings JI, Macfarlane GT, Englyst IN. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr.* 2001 Feb; 73 (2): 415 - 420.
- Hijova E, Chmelarova A. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy.* 2007 Aug; 108 (8): 354 - 358.
- Roberfroid MB. Dietary fiber, inulin, and oligofructose. A review comparing by their physiological effects. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1993 Feb; 33 (2): 103 - 148.
- Hotchkiss AT, Olano-Martin E, Grace WE, Gibson GR, Rastall RA. Pectic oligosaccharides as prebiotics. *Oligosaccharides in Food and Agriculture.* Washington DC, Virginia: EUA: American Chemical Society; 2003. 54 - 62 p.
- Durán-Mendoza T, Mendiola-Campuzano JVH, Urrieta-Saltijeral JM, Hernández-Vélez RM, Angulo-Guerrero O. Evaluación de la incorporación de fibra dietética procedente del bagazo de naranja en un embutido tipo longaniza. IV Simposio Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos; 2008; Villahermosa, Tabasco: México; 351-359 p.
- AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist International. Total, soluble and insoluble dietary fiber in foods. Method 991.43. Washington DC, Virginia: EUA; 1999.
- Ramírez-Chavarín NL, Wachter-Rodarte C, Pérez-Chabela ML. Characterization and identification of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked sausages as bioprotective cultures. *J Muscle Foods.* 2010 Jul; 21 (3): 585 - 596.
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J App Bacteriol.* 1960 Apr; 23 (1): 130 - 135.
- Muñoz FJ. Pares R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *App Environ Microbiol.* 1988 Jul; 54 (7): 1715 - 1718.
- Bustamante P, Mayorga L, Ramírez H, Martínez P, Barranco E, Azaola A. Evaluación microbiológica de compuestos con actividad prebiótica. *Rev Mex C Farm.* 2006 Apr-Jun; 37 (2): 5 - 9.
- Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. Principles of Fermentation Technology. 2th ed. Oxford, Inglaterra: Butterworth Heinemann; 1995. 13 - 31 p.
- Manderson K, Pinart M, Tuohy KM, Grace WE, Hotchkiss AT, Widmer W, et al. *In vitro* determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *App Environ Microbiol.* 2005 Dec; 71 (12): 8383 - 8389.
- Garau MC, Simal S, Rosselló C, Femenia A. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fiber and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium v. Canoneta*) by-products. *Food Chem.* 2007 Jan; 104 (3): 1014 - 1024.
- Clements RL. Organic acids in citrus fruits. II. Seasonal changes in the orange. *J Food Sci.* 1964 May; 29 (3): 281 - 286.
- Agustí M, Martínez-Fuentes A, Mesejo C. Citrus fruit quality. Physiological basis and techniques of improvement. *Agrociencia.* 2002 Sep; 6 (2): 1 - 16.
- Storey R, Treeby MT. The morphology of epicuticular wax and albedo cells of orange fruit in relation to albedo breakdown. *J Hort Sci Biotechnol.* 1994 Feb; 69 (2): 329 - 338.
- Carpita NC, Gibeaut DM. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 1993 Jan; 3 (1): 1 - 30.
- Lario Y, Sendra E, García-Pérez J, Fuentes C, Sayas-Barberá E, Fernández-López, J, et al. Preparation of high dietary fiber powder from lemon juice by-products. *Inn Food Sci Emerg Technol.* 2004 Mar; 5 (1): 113 - 117.
- Rossi M, Corradini C, Amaretti A, Nicolini M, Pompei A, Zannoni S, et al. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *App Environ Microbiol.* 2005 Oct; 71 (10): 6150 - 6158.
- Kaplan H, Hutkins RW. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *App Environ Microbiol.* 2000 Jun; 66 (6): 2682 - 2684.
- Pompei A, Cordisco L, Raimondi S, Amaretti A, Pagnoni U, Matteuzzi D, et al. *In vitro* comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. *Anaerobe.* 2008 Nov; 14 (5): 280 - 286.
- Cardelle-Cobas A, Corzo N, Olano A, Peláez C, Requena T, Ávila M. Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth. *Int J Food Microbiol.* 2011 Sep; 149 (1): 81 - 87.
- Yeo SK, Liong MT. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *J Sci Food Agric.* 2010 Jan; 90 (2): 267 - 275.
- Gopal P, Sullivan P, Smart J. Utilisation of galactooligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Int Dairy J.* 2001 Jan; 11 (1-2): 19 - 25.
- Aravantinos-Zafiridis G, Oreopoulou V, Thomopoulos CD. Fibre fraction from orange peel residues after pectin extraction. *Food Sci Technol-LEB.* 1994 Oct; 27 (5): 468 - 471.
- Ghoddusi HB, Grandison MA, Grandison AS, Tuohy KM. *In vitro* study on gas generation and prebiotic effect of some carbohydrates and their mixtures. *Anaerobe.* 2007 Oct-Dec; 13 (5-6): 193 - 199.
- Hernandez-Hernandez O, Sanz ML, Kolida S, Rastall RA, Moreno J. *In vitro* fermentation by human gut bacteria of proteolytically digested caseinomacropptide nonenzymatically glycosylated with prebiotic carbohydrates. *J Agric Food Chem.* 2011 Nov; 59 (22): 11949 - 11955.
- Stewart ML, Timm DA, Slavin JL. Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an *in vitro* fermentation system. *Nutr Res.* 2008 May; 28 (5): 329 - 334.
- Cardelle-Cobas A, Olano A, Corzo N, Villamiel M, Collins M, Kolida S, et al. *In vitro* fermentation of lactulose-derived oligosaccharides by mixed fecal microbiota. *J Agric Food Chem.* 2012 Feb; 60 (8): 2024 - 2032.
- Chen J, Liang R-h, Liu W, Li T, Liu Ch-m, Wu S, et al. Pectic-oligosaccharides prepared by dynamic high-pressure microfluidization and their *in vitro* fermentation properties. *Carbohydr Polym* 2013 Jan; 91 (1): 175 - 182.

VALIDATION OF A METHODOLOGY FOR INPATIENT PHARMACOTHERAPY FOLLOW-UP

VALIDACION DE UNA METODOLOGÍA PARA EL SEGUIMIENTO FARMACOTERAPEUTICO EN PACIENTE HOSPITALIZADO

Jesús BECERRA C. M.Sc.^{1*}, Fernando MARTINEZ M. Ph.D.², Martha BOHORQUEZ C. M.Sc.³,
 Martha L GUEVARA U. Q.F.¹, Edgar RAMIREZ N. Q.F.¹

Received: 25 May 2012 Accepted: 09 September 2012

ABSTRACT

Background: Pharmacotherapy follow-up is a practice in which the pharmacist assumes responsibility for the patient's drug-related Problems. Its goal is to achieve positive clinical outcomes. Methods to perform pharmacotherapy follow-up have centered principally on ambulatory patients. **Objective:** The purpose of this study is to propose and validate a methodology for inpatient pharmacotherapy follow-up. **Methods:** A systematic review was performed. This consisted in a comprehensive search of databases containing studies published in English or Spanish during 1998 - 2008, and that sought to improve the transfer of accurate information about Pharmacotherapy follow-up in inpatients. The key terms used to conduct the search were identified in consultation with clinical experts and included: Pharmacotherapy follow-up methods, pharmacotherapy follow-up, drug therapy problems, and validation. A comparative table was elaborated to differentiate and evaluate the advantages of each of the proposed methodologies. The information gathered allowed to propose a sequence of general steps for inpatient Pharmacotherapy follow-up. To validate the methodology, a descriptive study was carried out with 32 randomly selected patients and was independently followed up by two pharmacists to assess the reproducibility of the process. **Results:** *Pharmaceutical Care Practice: The Clinician's Guide*, proposed by Cipolle & Strand. *Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs*, the DÁDER method, and the IASER program, were selected. 79 drug therapy problems (DTPs) were identified and resolved, where errors in necessity of medication had the highest incidence (46.6%), followed by effectiveness (24.5%) and safety (28.9%). The degree of agreement among researchers in the identification and resolution of DTPs was quantified using the kappa coefficient, showing a high concordance (90% CI). The Fisher's exact test determined that DTPs are related to the duration of the follow up, number of medications, length of the stay and previous hospitalizations. **Conclusions:** The methodology allows identifying, preventing and resolving DTPs. It proved to be reproducible and have a high degree of concordance between applications.

Keywords: Pharmaceutical care, pharmacists, inpatient, validation.

RESUMEN

Antecedentes: El Seguimiento Farmacoterapéutico es la práctica profesional donde el farmacéutico asume la responsabilidad de la medicación del paciente con el objetivo de obtener resultados clínicos positivos. Los métodos actuales para realizar Seguimiento Farmacoterapéutico se han centrado principalmente en

¹ Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. Carrera 30 No.45-03. Bogotá Colombia.

² Facultad de Farmacia Universidad de Granada. Granada, España.

³ Departamento de Estadística. Universidad Nacional de Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: jbecerrac@unal.edu.co

pacientes ambulatorios. **Objetivos:** Proponer y validar una metodología de Seguimiento Farmacoterapéutico para paciente hospitalizado. **Métodos:** Se realizó una revisión sistemática mediante la búsqueda exhaustiva en bases de datos de estudios publicados en inglés o español durante el periodo 1998-2008. La búsqueda se concentró en estudios que utilizaron metodologías de Seguimiento Farmacoterapéutico en las cuales se identificara, previniera y resolviera problemas de la medicación de un paciente hospitalizado. Los principales términos utilizados para llevar a cabo la búsqueda fueron identificados en consulta con expertos clínicos e incluyó: métodos o metodologías, Seguimiento Farmacoterapéutico, seguimiento farmacoterapéutico en pacientes hospitalizados, problemas relacionados con medicamentos y validación de metodologías. Se realizó una comparación de las mismas, para establecer las ventajas y desventajas y la factibilidad de su aplicación en el entorno hospitalario. Para validarla se adelantó un estudio descriptivo en 32 pacientes, de manera aleatoria, con características distintas, que fueron seguidos de manera independiente por dos farmacéuticos para evaluar la reproducibilidad del proceso. **Resultados:** Las metodologías de Cipolle y Strand, Pharmaceutical Care Practice: the Clinician's Guide, Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs, el método Dader y el programa IASER, fueron seleccionadas. Se identificó y se resolvió 79 resultados negativos a la medicación (RNM), de necesidad (46,6%), efectividad (24,5%) y seguridad (28,9%). El grado de acuerdo entre investigadores en la identificación y resolución de RNMs se cuantificó con el coeficiente de concordancia kappa encontrando alto acuerdo (90% CI). La prueba Fisher relacionó características del paciente y cantidad de RNMs detectados. El tiempo de seguimiento, número de medicamentos, días de estancia y hospitalizaciones previas, tienen mayor relación. **Conclusiones:** La metodología diseñada permite identificar, prevenir y resolver RNMs, mostrando además ser reproducible y tener un alto grado de concordancia entre las aplicaciones.

Palabras clave: Atención Farmacéutica, farmacéutico, paciente hospitalizado, validación.

INTRODUCTION

Pharmaceutical Care is defined by Cipolle *et al.*, 2004 (1), as “a patient-centered practice in which the practitioner assumes responsibility for the patient's drug-related needs and is held accountable for this commitment”.

The goal of Pharmaceutical care is to procure positive clinical outcomes. Some of the desirable outcomes are: the cure of the patient's disease, elimination or amelioration of the patient's symptoms, arresting or slowing of a disease process, and preventing a disease or symptomatology. This, in turn, involves three major functions: to identify, resolve and prevent current and potential drug therapy problems (DTPs) (2, 3).

DTPs are undesirable events experienced by the patient that are related, or are suspected to be related, to the drug therapy and that interfere with the success of the drug therapy (4, 5).

DTPs can be classified into the following categories:

- **Necessity:** This category refers to the administration of unnecessary drug therapy (invalid medical indication of the drug therapy, multiple drug products are being used for a condition that requires a single drug, the medical

condition is more appropriately treated with nondrug therapy, drug therapy is being taken to treat an avoidable adverse reaction associated with another medication, the problem is being caused by drug abuse, alcohol use, or smoking) and additional drug therapy (a medical condition related to not receiving a necessary medication, preventive drug therapy to reduce the risk of developing a new condition, a medical condition requires of additional pharmacotherapy to attain synergistic or additive effects).

- **Effectiveness:** Problems related to the inefficacy of the drug therapy (the drug is not the most effective for the medical problem being treated, the medical condition is refractory to other drug products, the dosage form of the drug product is inappropriate, and the drug product is not an effective product for the indication being treated) and low drug dosages (the dose is too low to produce the desired response, the administration interval is too infrequent to produce the desired response, a drug interaction is reducing the amount of active drug available, and the duration of the drug therapy is too short to produce the desired response).
- **Safety:** These include adverse drug events (ADEs; when the drug causes an undesirable

reaction that is not dose-related, a safer drug product is required due to risk factors, a drug interaction causes an undesirable reaction that is not dose-related, the dosage regimen was administered or changed too rapidly, the drug product causes an allergic reaction, and the drug product is contraindicated due to risk factors) and problems related to high drug dosages (the dose is too high, the dosing frequency is too short, the duration of the drug therapy is too long, a drug interaction occurs resulting in a toxic reaction to the drug product, and the dose was administered too rapidly) (1, 6).

Studies have shown that the most frequent DTP is related to missing the administration of the proper dosage or not taking the drug at the proper time, a problem that could be easily detected by a pharmacist (7). About 19 - 80% of DTPs can be avoided or prevented (8, 9). ADEs such as taking the wrong medication or having an adverse reaction to the medication are reported in 11% of patients (10). Bates *et al.*, 1995 (11), identified 247 ADEs and 194 potential ADEs, of which 1% had a fatal outcome and 42% could have been prevented.

In Ibero-America, Pharmacotherapy follow-up studies have focused on specific health services, a particular type of patient or disease, or on a certain group of drugs (12 - 14). This study proposes and validates a pharmacotherapy follow-up methodology that can be used to detect DTPs on inpatient patients and to validate the methodology procedure.

It is not possible to promote any pharmacist interventions as positive models for reducing medication errors and drug therapy problems. Insufficient research was undertaken with any particular type of intervention, and there were concerns regarding the level of evidence and quality of research (15).

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in two stages:

Stage 1: Assemblage of the proposed methodology

It included a systematic review of the literature. This consisted in a comprehensive search of databases containing studies published in English or Spanish during 1998 - 2008, and sought improving the transfer of accurate information about Pharmacotherapy follow-up on inpatients. The key terms used to conduct the search were identified in consultation

with clinical experts and included: Pharmacotherapy follow-up methods, pharmacotherapy follow-up, drug therapy problems, and validation. One reviewer examined all titles and abstracts. The full articles of potentially relevant papers were obtained and each study was evaluated according to the following criteria: type of intervention, country and place where the study was carried out, inclusion and exclusion criteria, number of participants, and the proportion of evaluated patients. Once having evaluated the quality of the studies, the chosen methodologies were selected as a model, evaluating the steps proposed by each Pharmacotherapy follow-up methodology and its results.

A comparative table was elaborated to differentiate and evaluate the advantages of each of the proposed methodologies. The information gathered allowed to propose a sequence of general steps for inpatient Pharmacotherapy follow-up.

Stage 2: Validation of the proposed pharmacotherapy follow-up methodology

An observational descriptive study of a cross-sectional nature was carried out in hospitalized elderly patients during 4 months (January - May 2008). Patients were chosen by simple random sampling without replacement. The inclusion criteria considered were males and females over the age of 60 who had multiple pathologies (≥ 3), were taking at least two or more drugs concurrently and that had been under hospital care for less than 24 h. Patients with a hospital stay of more than 24 h were excluded from the study.

The sample size was calculated taking into account the standard deviation of the age of the geriatric patients under hospital care during the last year, which was 10.3 years. Age information was supplied by the hospital's statistical office and the standard error was set at 3 years. The resulting sample size for a confidence level of 90% was 32 patients, according to equation 1:

$$n = (1.645 * s_{age} / e)^2 \quad \text{Equation 1.}$$

This stage encompassed the selection of patients: Among the patients admitted to the hospital database, those over the age of 70 who had been hospitalized for no more than 1 day were selected. Each patient's medical history was reviewed to check the number of prescribed drugs and

comorbidities; only those patients who were being administered two or more drugs and had three or more comorbidities were classified as eligible and given a sequential number. Subsequently, the selection was randomized. Each researcher was in charge of the simultaneous Pharmacotherapy follow-up of four patients until patients were discharged. The selection process was repeated until gathering the entire sample of 32 patients, to which the proposed methodology was applied.

This stage focused on determining the capacity of the new methodology to identify, prevent and resolve DTPs. The sampled patients included inpatients with different characteristics to allow assessing the robustness of the methodology. Each patient received Pharmacotherapy follow-up from two pharmacists independently to assess the reproducibility of the methodology. The methodology was validated according to the kappa coefficient and its significance was determined at a 90% of confidence in order to establish whether the two researchers using the same methodology agreed in the detection of DTPs. Statistical procedures were carried out using the free software R. Additionally, the effects that characteristics such as gender, age, number of comorbidities, length of hospital stay, number of previous hospitalizations and prescribed medications may have on the appearance of DTPs were also analyzed. DTPs were classified into necessity, efficacy and safety. Finally, the average time required by a pharmacist to implement the methodology was estimated and the influence of this time on the results was also assessed.

RESULTS

A systematic review established that there are several Pharmacotherapy follow-up methodologies and programs. The most widely documented and applied Pharmacotherapy follow-up methods were used as reference to propose a new methodology. The methods were: pharmaceutical care Practice: The Clinician's Guide developed by Cipolle & Strand (1). Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs, proposed by Young, Kradjan, Guglielmo, Alldredge, Corelli and Koda-Kimble, The DÁDER Pharmacotherapy follow-up Method developed by the Research Group on Pharmaceutical care, University of Granada, Spain and The Iaser Program, developed by the University of Valence (16 - 18).

The DADER method is useful for any type of patient, suffering any disease or health condition, in any environment, and applicable by any pharmacist. It was originally designed for community pharmacy and is currently used at other health care levels. In 2005, it was revised with two fundamental objectives: universalization and simplification, so it could be applied to inpatients. The adapted DÁDER method consists of 7 stages: service offering, first interview, assessment form, study stage, assessment stage, intervention stage and results of the intervention (19).

The Pharmaceutical Care Practice developed by Cipolle & Strand can be applied in all areas: community, hospital, long-term care, and clinic. It can be used to address all types of patients with all types of diseases and being administered with any type of drug treatment (1). The steps to follow up the patient's pharmacotherapy are: the diagnostic study of the pharmacotherapy, evaluation of the patient's medications, the needs related to the therapy in order to identify drug problems and their causes, developing care plans that include therapy goals and follow-up evaluation of results. All decisions of the Pharmacotherapy follow-up practice are documented (20).

The IASER[®] method is a standardized approach to Pharmaceutical Care, specialized in hospital care. It envisions five sequential and cyclical processes: identification of patients with improvement opportunities, pharmaceutical action, pharmacotherapy follow-up, (individual) evaluation, and publication of the results. It provides an operational outline with special focus on the health care process (18).

The SOAP method is a strategy for medical history analysis based on the health problems of the patient. It consists of 4 elements: *subjective (S)*: it is important to take into account subjective information that other health care professionals include in the medical record; *objective (O)*: it corresponds to the data registered in the medical history, such as different test results, procedures and evaluations; they can include vital signs, findings of the physical examinations, X-ray results, ECG, etc.; drugs are also considered as objective information; *analysis (A)*: refers to the objective and subjective information that must be used to develop a therapeutic plan. The method has three main elements for the evaluation of each problem: etiology, revision of the recommended therapy and evaluation of the ongoing therapy and/or new therapies; and finally, *the plan (P)*: which

considers all the recommendations obtained during the analysis, stipulates drug changes (inclusion or removal) and the strategies to be determined, goals to be achieved and the parameters that will allow continuing with the plan (16, 21).

Table 1 shows the most relevant aspects considered in the design of the proposition for a new Pharmacotherapy follow-up methodology. The aspects of the proposed methods are shown in Figure 1.

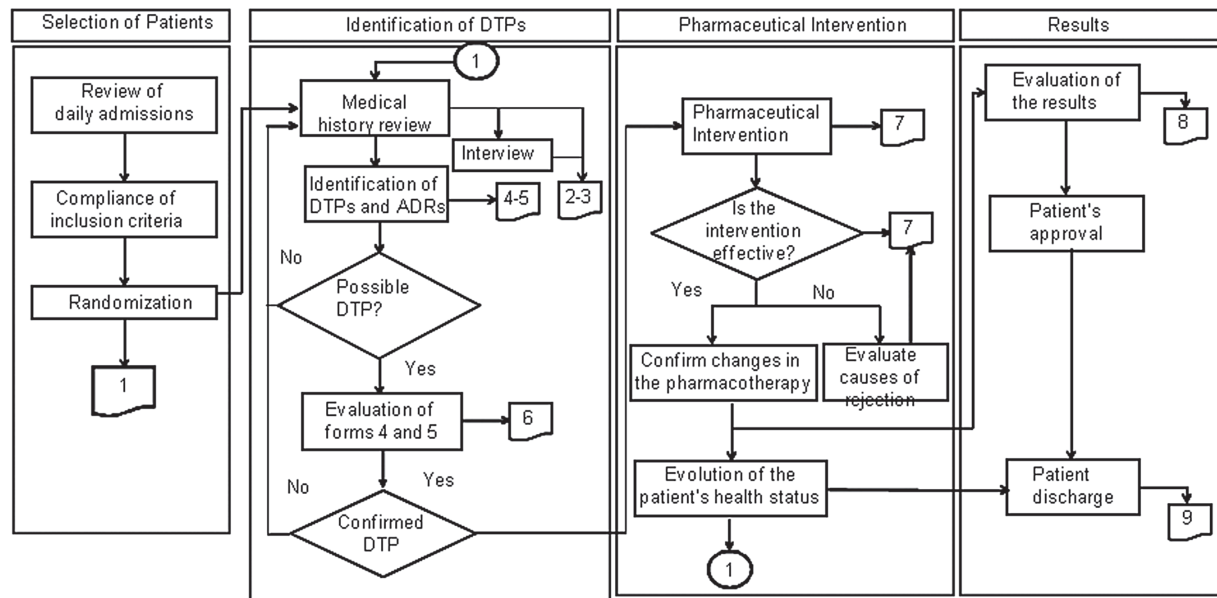


Figure 1. Diagrammatic representation of the proposed pharmacotherapy follow-up methodology.

Patient characterization

The demographic characteristics of the patients were considered to analyze risks factors. For example, age to establish administration considerations, weight to individualize the dose, etc. The sample consisted of 62% males and 38% females. The average age of the patients was 81.7 years (range 70 - 93) and their average weight 62.6 kg. According to the reasons for the consultation, 50% of the patients complained of pain, angina and dysnea as their main health problems. After the number of hospitalizations was established through the hospital reports and an interview with the patient, it was found that 37.5% of the patients had been hospitalized in 3 previous occasions. The number of hospitalizations could not be established for 22% of the patients because they couldn't remember the exact number and no hospital records were available. The average time of hospitalization was less than 10 days for 90% of the patients.

Patients presented a total number of 98 illnesses. Of these, 34% were cardiopathies, 11.2% dyslipemia, and 10.2% pulmonary obstructive chronic disease (POCD; Asthma) and the remaining 44.6%

corresponded to a variety of other illnesses, thus hindering a more detailed classification. The number of medications ranged from 3 to 25 per patient, with 81.25% of patients taking more than 9 drugs. Of these drugs, 52% could be grouped into one of the following five pharmacological groups: cytoprotective agents, painkillers, anti-hypersensitive drugs, anticoagulant drugs and antibiotics, with cytoprotective agents being the most prescribed medication (11.4%).

The identification and classification of DTPs has an important influence on the assistance that a patient receives. A total of 79 DTPs were identified and treated, not including undetected adverse drug interactions. DTs were classified according to the DÁDER method that DTPs related to receiving or not receiving a necessary medication were the most frequent ones (46.6%), followed by DTPs due to effectiveness (24.5%) and safety (28.9%).

Among DTPs related to necessity, 75% were due to receiving unnecessary drugs and 25% to untreated health conditions. In 73% of the DTPs associated to effectiveness, an inappropriate drug was administered and in 27% the administrated dosage was too low. All DTPs related to safety corresponded to adverse drug reactions.

Table 1. Comparison of the reviewed and proposed pharmacotherapy follow-up methodologies.

Cipolle & Strand and DÁDER	IASER	Proposed Methodology
<i>Service Offering</i>		
To the patient or health practitioner (doctor, pharmacist). When a drug-related patient need is detected. Verbally using positive expressions to help catching the patient's attention. Cipolle & Strand does not include this stage.	To the patient or health practitioner (doctor). Upon identification of a DTP. The recognition of the patient is independent of the pharmacotherapy follow-up.	To the attending doctor. Subjected to obtaining informed consent of the patient and/or closest available relative. Permanent service that can be accessed as an ambulatory care.
<i>Pharmaceutical Interview – First Interview</i>		
Obtaining initial information about the patient's health status and treatment. A pharmacotherapy history is opened. Comprises three aspects: Health concerns and problems. Drugs being taken, revision of the drug storage bag, questions about drug knowledge and drug treatment adherence. General review by body systems. The information is provided by the patient.	Sources of information: 1) Interviews with the doctor, patient and/or caregiver. Collecting information about clinical and diagnostic parameters, adherence to drug treatment, quality of life and DTPs. 2) Monitoring: validation of drug prescriptions, pharmacokinetic monitoring and history of DTP alerts. 3) Reviewing the pharmacotherapy history on the clinical records and the evolution of signs and symptoms. Records: individual pharmacotherapy follow-up sheet per patient, checklist of having collected the necessary patient information and health status report.	Various sources of information: interviews to the patient, medical history, list of medications, drug prescriptions, interviews to caregivers. Data is registered using DADER and IASER forms. Reviewing drug dispensation and administration procedures. Characterization of the patient and DTP identification. The family background, therapeutic, radiology and surgical histories are established based on the medical history.
<i>Status of the Situation</i>		
Relating health problems and drugs taken on a certain date. Organizing first interview data: general data, health problems, drugs, assessment of the drug therapy, and DTP classification. This is done on a daily basis for inpatients.	Filling out pharmacotherapy follow-up forms. Establishing the possible cause of the patient's health problems. Deciding on the action plan or intervention strategy.	The status of the situation is done according to the DÁDER and Cipolle & Strand methods.
<i>Study Stage</i>		
Reviewing the literature regarding an appropriate pharmacotherapy action plan. Treatment is applied in compliance with the pharmacist's criteria and methodology to approach the situation.	The intervention strategy is designed according to the subjective, objective and analysis plan (SOAP) methodology.	The study stage was adopted from the DÁDER method.
<i>Assessment Stage</i>		
Conformation of DTPs. The patient is assessed using algorithms.	The patient is structurally assessed using algorithms.	Confirming drug and DTP information gathered for each patient to generate an intervention strategy. DTPs are classified according to the DÁDER method.
<i>Intervention Stage</i>		
Modifying the treatment as possible to: resolve or prevent DTPs, achieve results and instruct the patient. Sharing decisions with the patient to improve treatment adherence. Types of pharmaceutical intervention: on the number of drugs, doses, dosage, and route of administration. Adding, removing or changing medications. Educating the patient about appropriate drug administration and non-pharmacological measures. Intervention measures are to be communicated to other health professionals by written report. Such report should include: Patient data, reason for referral, pharmacist opinion, dismissed. Defining an intervention schedule and subsequent follow-up visits. Plan of action. Scheduling the patient, performing interventions and timelines. There are two possible schedules for patient interviews.	Algorithm-based assessment of the pharmaceutical intervention. Results: Cure, delay disease progression progress, reduction or complete elimination of symptoms, or prevention of disease or symptoms. • The pharmacological follow-up is qualified according to the following scale: 1-negative, 2-no significant change, 3-positive risk reduction, 4-positive risk reduction, without documented DTP warnings, interventions to solve the clinical problem or direct contribution to the prevention or resolution of DTPs, 5-positive risk reduction with a documented direct contribution to DTP prevention and resolution. Assessing the economic (cost savings and follow-up expenses). Elaborating a report of the patient. This should include: patient name, identified DTP, intervention, result of the intervention, pharmacist signature.	Recommendations to the attending doctor are to be documented. Identifying, preventing and resolving DTPs. The attending doctor is to be advised of specific drug-related problems or risks to the patient.

Cipolle & Strand and DÁDER	IASER	Proposed Methodology
<i>Follow-up Interviews</i>		
Ending of the pharmacotherapy follow-up is up to the patient or pharmacist decision. Follow-up interview are meant to: Assess the patient and doctor’s response to the intervention. Confirm adherence to the intervention strategy. Gather information about the intervention outcome. Records of each follow-up interview are to be kept.	Follow-up interviews and continuous check-up visits to the patient are done during the Pharmacotherapy follow-up stage. If the goal of the intervention is not being achieved, a new interview is scheduled.	The patient is interviewed during its hospital stay if any information or confirmation on the patient’s health status is needed. If this is not possible, the patient should be interviewed at enrollment to the program and before hospital discharge. Upon discharge the patient is referred to ambulatory Pharmacotherapy follow-up.

Interventions can resolve the DTPs, prevent onset of new DTPs and satisfy the patient’s needs. Although this was not an intervention study, for ethical considerations DTPs were treated as soon as they were detected. Prescription errors were the most common cause of intervention (28%).

Information on the patient’s pharmacological follow-up supplied by the two researchers who had similar training and experience was collected at the same time. The degree of agreement of the researchers on DTPs detection and resolution was quantified with the Kappa coefficient (κ) and subjected to the respective test of hypothesis, which resulted significant at a 90% confidence level (Table 2). In regards to the detection of DTPs related to necessity, the degree of concordance between researchers was almost perfect (see Table 2 and 3), which demonstrates the strength of the methodology for DTP identification (22).

Documenting DTPs simultaneously with all other health professionals allows pharmacists to act together with the patient and the attending doctors so as to prevent DTPs during hospitalization. The use of the proposed Pharmacotherapy follow-up methodology allowed researchers to detect preventable DTPs with a good degree of agreement (Table 4).

The results of the Fisher’s exact test allowed determining whether there was a relationship between the patient’s general characteristics and the number of DTPs being detected. As shown in (Table 4), the number of DTPs was significantly related to the length of time the patient was under Pharmacotherapy follow-up, the number of medication being administered, duration of the hospitalization and the number of previous hospitalizations.

Table 2. Concordance in DTP detection between researchers.

Aspect	Kappa	p value	Cases with identical classification (%)
Necessity	0.814	0.006	90.9
Effectiveness	-0.038	0.898	54.6
Safety	0.233	0.425	72.7

Table 3. Concordance in detecting preventable DTPs.

Identified DTPs	Kappa	P value	Cases with identical classification (%)
Prescription	0.814	0.006	90.9
Administration	0.421	0.087	81.8
Indication	Perfect concordance		100
Dispensation	Perfect concordance		100

Table 4. Tests of independency. Patient’s characteristics versus detecting DTPs.

Variable (X)	p value Fisher’s exact test for DTPs with each X
Time of Pharmacotherapy follow-up	0.049
Numbers of medications	0.056
Days of hospitalization	0.389
Previous hospitalizations	0.024
Number of comorbidities	0.513
Age	0.337

The amount of previous hospitalizations is relevant in the onset of DTPs as it could be related to the presence of undiagnosed pathologies and therefore to reiterative hospitalization.

Finally, the detection of DTPs depended on the pharmacists skills and clinical experience, as shown by the significant correlation found between

the time of pharmacotherapy follow-up and the patient's improvement; the longer the length of the pharmacotherapy follow-up is, the smaller the patient's risk to developing DTPs. The estimated average time necessary to conduct pharmacotherapy follow-up varied between 3.5 and 5 hours per patient, per day.

Ethnic differences in attitudes to medicines and medicines-taking are not apparent, although there are some commonalities in terms of needs of support and advice around medicines use (23).

DISCUSSION

A careful examination of the Pharmacotherapy follow-up methodologies selected based on the literature revision indicated that the Applied Therapeutics method: The Clinical Use of Drugs is not designed for pharmacists, but written for medical evaluation, as it contributes with an appropriate methodology for addressing SOAP clinical cases. This methodology was not considered for the design of the pharmacological follow-up methodology here presented. The method proposed by Cipolle & Strand and the DÁDER method share high similarity. The difference is that the DÁDER method describes the drug assessment and includes two activities, current situation and study phase, none of which is present in Cipolle & Strand's method. Moreover, it considers checking the patient's drug bag as an important activity to help in the pharmacological follow up. In Cipolle & Strand's method, the documentation of the intervention is unclear and could be understood that it is left to the discretion of the pharmacist what to do and how to act in the intervention, as no record of such is left.

The main difference between these two approaches lies in the DTP classification system. In Cipolle & Strand there are four categories: indication, effectiveness, safety and compliance, while in the DÁDER method there are three categories: indication, effectiveness and safety; adherence is not included as it does not correspond to a clinical outcome but rather to a process.

The IASER method shows significant differences compared to other methods. It implements a quality assurance criterion to the practice of Pharmacotherapy follow-up, particularly in such a specialized environment as hospitals.

A careful revision of the three methodologies described above was done to design a pharma-

cotherapy follow-up methodology suitable for inpatients. The resulting methodology consists of 4 sequential and cyclic steps, which constitute the core of the Pharmacotherapy follow-up procedure: Identification and confirmation of DTPs, pharmaceutical intervention and evaluation of the results of the pharmaceutical intervention. It was necessary to design and adapt patient forms.

DTPs related to the need for new or additional drug therapy can be identified by comparing the patient's medication needs with the need for drug therapy. The pharmacist cannot detect DTPs by simply reviewing the list of drugs taken by a patient, i.e., it is not enough to focus on the medication, it is necessary to focus on patient as well. Pharmacological follow-up methodologies help to center pharmacy activities, which used to focus exclusively on the medication, now on the patient as well.

To identify the drug outcomes, additional information to the one provided in the medical history should be gathered by interviewing the patient directly. The quality of the drug information in the medical history is not good for this purpose, probably because it is built by professionals other than the pharmacist; this information is crucial because the effectiveness and safety of the pharmacotherapy is assessed based on it and on laboratory tests, diagnostic procedures, a physical exam, signs and symptoms. The identification of DTPs can be guaranteed by conducting a systematic and continuous follow up of the pharmacotherapy. The sporadic appearance of visible symptoms such as a rash, redness, and the like, provide a mechanism for identifying DTPs associated to drug safety.

Although it is best not to prolong a patient's stay in the hospital, investing more time to the pharmacological follow-up increases the probability of detecting DTPs; a process to which the pharmacist can contribute significantly.

CONCLUSIONS

The Pharmacotherapy follow-up methodology for inpatients described in this paper is reproducible, as indicated by the high degree of reproducibility found in the detection of DTPs between independent researchers applying the same methodology. Such concordance was not affected by demographics aspects or health conditions of the patients included in this study, which allow concluding that the methodology is robust for different types of patients.

This methodology is suitable for identifying, preventing and resolving DTPs, without restricting the health practitioner's freedom to achieve these goals through different mechanisms. Moreover, this DTP detection procedure is explicitly described so that it can be uniformly applied by pharmacists and taught to students interested in learning about pharmacotherapy follow-up.

REFERENCES

1. Cipolle RJ, Strand LM, Morley PC. *Pharmaceutical care practice: the clinician's Guide*. 2nd ed. United States of America: The McGraw-Hill Companies; 2004. 394 p.
2. Cobaugh DJ, Amin A, Bookwalter T, Williams M, Grunwald P, Lacivita C, Hawkins B. ASHP-SHM joint statement on hospitalist-pharmacist collaboration. *Am J Health Syst Pharm*. 2008 Feb 1; 65 (3): 260 - 263.
3. Hepler CD, Strand LM. Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care. *Am J Hosp Pharm*. 1990 Mar; 47 (3): 533 - 543.
4. Van Mil JW, Westerlund LT, Hersberger KE, Schaefer MA. Drug-related problem classification systems. *Ann Pharmacother*. 2004 May; 38 (5): 859 - 867.
5. Fernandez-Llimos F, Faus MJ, Gastelurrutia MA, Baena MI, Martinez-Martinez F. Evolución del concepto de problemas relacionados con medicamentos: resultados como el centro del nuevo paradigma. *Seguimiento Farmacoterapéutico* 2005; 3 (4): 167 - 188.
6. Comité de Consenso de Granada. Tercer Consenso de Granada, sobre Problemas Relacionados con Medicamentos (PRM) y Resultados Negativos de la Medicación (RNM). *Ars Pharm*. 2007; 48 (1): 5 - 17.
7. Crook M, Ajdukovic M, Angley C, Soulsby B, Doecke C, Stupans I, et al. Eliciting comprehensive medication histories in the emergency department: the role of the pharmacist. *Pharmacy Practice*. 2007 Abr-Jun; 5 (2): 78 - 84.
8. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug Reactions in hospitalized patients: A meta-analysis of prospective studies. *JAMA*. 1998 Apr; 279 (15): 1200 - 1205.
9. Classen DC, Pestotnik SL, Evans RS, Lloyd JF, Burke JP. Adverse drug events in hospitalized patients: excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA*. 1997 Jan; 277 (4): 301 - 306.
10. Eaton L. Adverse reactions to drugs increase. *BMJ*. 2002 Jan; 324 (7328): 8.
11. Bates DW, Cullen DJ, Laird N, Petersen LA, Small SD, Servi D, et al. Incidence of adverse drug events and potential adverse drug events: implications for prevention. *JAMA*. 1995 Jul; 274 (1): 29 - 34.
12. Silva M, Calleja M, Tuneu L, Fuentes B, Gutiérrez J, Faus MJ. Seguimiento del tratamiento farmacológico en pacientes ingresados en un servicio de cirugía. *Farm Hosp*. 2004 ; 28 (3): 154 - 169.
13. Fontana D, Soláthurry N. Cuidado farmacéutico en pacientes pediátricos hospitalizados: adaptación de la metodología Dáder. *Farm Hosp*. 2003; 27 (2): 78 - 83.
14. Gil-Navarro MV, Bautista J, Santos B, Calleja MA, Marín-Gil R. Seguimiento farmacoterapéutico en pacientes hospitalizados en tratamiento con fentanilo transdérmico. *Rev Soc Esp Dolor*. 2006; 13 (4): 238 - 245.
15. Manias E, Williams A, Liew D. Interventions to reduce medication errors in adult intensive care: a systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2012 Feb 20; 74 (3): 411 - 423.
16. Koda-Kimble MA, Young LY, Kradjan WA, Guglielmo BJ, Alldredge BK, Corelli RL. *Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publisher; 2006. Chapter 9, 10; 76.
17. Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica, Universidad de Granada. *Cuidado farmacéutico: Método Dáder*. 3^a rev. *Pharmacy Practice*. 2006; 4 (1): 44 - 53.
18. Climenti M, Jiménez N. *Manual para la atención farmacéutica*. 3^a ed. Valencia, España: AFAHPE. Hospital Universitario Dr Peset; 2005. 157 p.
19. Sabater HD, Silva-Castro MM, Faus MJ. *Método Dáder: Guía de seguimiento Farmacoterapéutico*. 3^a ed. Granada, España: Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica (CTS-131). Universidad de Granada; 2007. 128 p.
20. Zierler-Brown S, Brown TR, Chen D, Blackburn RW. Clinical documentation for patient care: Models, concepts, and liability considerations for pharmacists. *Am J Health Syst Pharm*. 2007 Sep; 64 (17): 1851-1858.
21. Bhopal J. Simple soap system. *Brit Med J*. 1981 Oct; 283 (6296): 889 - 892.
22. Fisher, RA. *Statistical Methods for Research Workers*. 14th ed. CO: Hafner; 1970. 362p.
23. Bassett CD, Krass I, Bajorek B. Ethnic differences of medicines-taking in older adults: a cross cultural study in New Zealand. *Int J Pharm Pract*. 2012 Apr; 20 (2): 90 - 98.

VARIABLES PSICOSOCIALES EN EL SEGUIMIENTO FARMACOTERAPÉUTICO DE PERSONAS CON EPILEPSIA EN COLOMBIA

PSYCHOSOCIAL FACTORS IN THE PHARMACEUTICAL CARE OF PEOPLE WITH EPILEPSY AT COLOMBIA

Claudia M. VARGAS^{1,2}, Claudia P. VACCA^{1*}, Juan B. SIMBAQUEBA²

Recibido: Septiembre 21 de 2012 Aceptado: Abril 04 de 2012

RESUMEN

Antecedentes: Diferentes estudios han mostrado que factores psicosociales y culturales pueden tener un impacto considerable sobre los resultados de la terapia farmacológica en las personas con epilepsia. Incorporar en la metodología de Seguimiento Farmacoterapéutico variables psicosociales y culturales relevantes en el contexto colombiano le permitiría al farmacéutico optimizar la detección y resolución de problemas relacionados con medicamentos que presente el paciente, de modo que se alcancen los resultados esperados de la farmacoterapia. **Objetivos:** Explorar variables psicosociales y culturales que pueden ser incorporadas al seguimiento farmacoterapéutico dirigido a pacientes con epilepsia. **Métodos:** Para determinar los factores psicosociales y culturales que serían incluidos en el instrumento se utilizó la metodología Delphi. Las variables seleccionadas fueron incorporadas al método Dáder ajustado para Colombia mediante la adaptación de una encuesta de Conocimientos, Actitudes y Prácticas. Se realizó una prueba piloto en la que participaron 21 pacientes. Luego de algunos ajustes, el instrumento fue aplicado a 70 pacientes con epilepsia, con al menos un mes de tratamiento farmacológico, no sometidos a cirugía, atendidos en una institución especializada en la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia. El análisis estadístico consistió en un análisis univariado para describir los resultados y un Análisis de Correspondencias Múltiples (ACM). **Resultados:** En la prueba piloto se encontró necesidades recurrentes de información sobre la epilepsia y el tratamiento, y se diseñó folletos para apoyar actividades educativas. El nivel de conocimientos sobre la epilepsia de los pacientes era aceptable. Se encontró correspondencia entre la afiliación al régimen de salud subsidiado y problemas de acceso a medicamentos y una posible correspondencia entre los sentimientos de vergüenza y baja autoestima con alta frecuencia de las crisis. **Conclusiones:** El instrumento permitió evaluar variables psicosociales y culturales en el marco del Seguimiento Farmacoterapéutico de personas con epilepsia, detectar problemas relacionados con la terapia y realizar intervenciones para su solución en la población incluida en el estudio. Los hallazgos son un primer acercamiento a la descripción de factores psicosociales que afectan el desempeño de la terapia, en especial la dinámica de redes sociales, los problemas emocionales, el nivel educativo máximo y los conocimientos sobre la epilepsia.

Palabras clave: Anticonvulsivantes, epilepsia, factores psicosociales, Seguimiento Farmacoterapéutico, Colombia.

¹ Estudiante de Maestría en Ciencias. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

² Consultor Fundación IFARMA. Bogotá, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: cpvacag@unal.edu.co

ABSTRACT

Background: It has been suggested elsewhere that psychosocial factors could have a negative impact on the outcomes of pharmacotherapy of patients with epilepsy. The inclusion of relevant psychosocial factors in Colombia's context in the pharmaceutical care's methodology would optimize the detection of drug related problems and its solution by the pharmacists, thus improving pharmacotherapy outcomes. **Objectives:** To explore psychosocial and cultural factors that could be incorporated in the pharmaceutical care of people with epilepsy, and design a survey in order to do so. **Methods:** The psychosocial factors to be included were first identified using the Delphi method, and were later incorporated in the Colombia-adjusted Dader's pharmaceutical care methodology through a knowledge, attitudes and practices survey. Pilot test was carried out with 21 patients and then the survey was adjusted as necessary. The adjusted survey was applied to 70 epilepsy patients being treated in a specialized institution at Cartagena (Colombia), aged between 15 and 60 years, with at least one month of pharmacological treatment, and without a history of previous epilepsy related surgery. Univariate statistical analysis and Multiple Correspondence Analysis was applied. **Results:** In the pilot analysis, recurrent needs of knowledge about epilepsy and anticonvulsant treatment were found, and brochures were designed to support educational interventions. The patient's knowledge level about epilepsy and its treatment was acceptable. Correlation between subsidized health insurance and drugs access problems, along with a possible correspondence between stigma feelings and high frequency crisis were found. **Conclusions:** The survey allowed to explore psychosocial and cultural factors in the framework of pharmaceutical care of people with epilepsy, the detection of drug related problems and to intervene to solve them. These findings are a first approach to the description of psychosocial factors affecting the performance of pharmacological therapy, especially the dynamic of social networks, emotional problems, the maximum educational level and knowledge about epilepsy.

Keywords: Anticonvulsants, Colombia, epilepsy, Pharmaceutical Care, psychosocial aspects.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia se define como un desorden cerebral caracterizado por una predisposición duradera para generar crisis epilépticas (alteraciones del patrón normal de la actividad neuronal), asimismo, por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta condición (1). En Colombia la epilepsia tiene una prevalencia entre 1,5 y 2,4% (2).

El control de las crisis de epilepsia depende de un correcto diagnóstico y de tratamiento médico adecuado, el cual debe considerar tanto las características particulares de algunos medicamentos anti-convulsivantes (farmacocinética compleja, estrecho margen terapéutico, perfil de seguridad a corto y largo plazo, teratogenicidad), como la influencia que tienen los hábitos de vida del paciente sobre dicho control, su salud emocional y otros factores psicosociales y culturales (1, 3).

En América Latina se ha documentado que la epilepsia es más frecuente en la población de bajos recursos y que los problemas sociales relacionados con el tratamiento adecuado son principalmente la dificultad de acceso a los servicios de salud, la ausencia de especialistas, las cuales pueden estar

relacionadas en parte con la organización del sistema de salud, y la carencia de conocimientos adecuados sobre la epilepsia de los médicos generales. Estos factores hacen que el control de esta condición con tratamiento farmacológico se reduzca del 70% al 25% (1).

En Colombia, el sistema de salud está dividido en dos regímenes de aseguramiento, el régimen contributivo que cubre a los trabajadores con ingresos iguales o superiores a un salario mínimo; y el régimen subsidiado que se encarga del aseguramiento de todas las personas sin capacidad de pago. Los aseguradores o entidades promotoras de salud (EPS del régimen contributivo o EPS-S del régimen subsidiado), son las encargadas de organizar la red de prestación de servicios a través de las instituciones prestadoras de servicios (IPS) y de ofrecer el Plan Obligatorio de Salud (POS) para el régimen contributivo o el POS-S para el régimen subsidiado (4).

Al momento del desarrollo del estudio, la cobertura de procedimientos y medicamentos del régimen subsidiado (POS-S) era limitado con respecto al régimen contributivo (POS), dado que los afiliados sólo tenían acceso a atención de urgencias

y a servicios de primer nivel y el acceso a servicios especializados está condicionado a un copago (5, 6).

Tanto los copagos como los costos de transporte y/o medicamentos que el paciente debe asumir cuando no cuenta con un centro de atención médica o un punto de entrega de medicamentos cerca a su lugar de vivienda, o cuando el medicamento no es entregado oportunamente, pueden superar la capacidad económica de la persona y su familia convirtiéndose en una barrera de acceso (6).

Adicionalmente, las dificultades culturales relacionadas con el estigma, la discriminación, los prejuicios y las creencias erróneas sobre la epilepsia pueden llevar a que una persona no dé a conocer su situación y tampoco busque asistencia médica (1). La estigmatización de la epilepsia tiene un fuerte impacto sobre la calidad de vida del paciente y puede tener gran influencia en el desempeño social de las personas (1, 7), dificultando el desarrollo y sostenimiento de relaciones interpersonales, así como su desempeño en los ámbitos escolares y laborales (1, 8). En este último caso, se ha encontrado que la epilepsia puede causar dificultades al paciente en la consecución de un trabajo, y en caso de lograrlo, no será uno que emplee todas sus capacidades laborales (9, 10).

Diversos estudios han demostrado que cuando una persona con epilepsia tiene un amplio conocimiento de su condición, tiende a sentirse menos estigmatizada, y que esta tendencia es similar en la población general, es decir, en la que las personas con un mayor conocimiento de la condición o que conocen a alguien que tiene epilepsia tienen mejores actitudes hacia estas personas (7, 9, 11).

El control de las crisis se ha encontrado como el mejor factor predictor del nivel de estigma de las personas con epilepsia, puesto que cuando hay baja frecuencia o remisión de las crisis aumenta la sensación de bienestar y la satisfacción con su vida (7, 12, 13).

Por último, otros factores psicosociales que han mostrado influencia sobre el sentimiento de estigma y la calidad de vida percibidos por las personas con epilepsia son la edad, el género, el estatus socioeconómico, el nivel educativo, la situación laboral, el acceso a servicios de salud, el estado civil, la percepción de estigma, los desórdenes psicológicos, como la depresión, y la percepción de su condición (14 - 16).

Colombia carece de estudios epidemiológicos sobre los factores psicosociales y culturales relacio-

ados con la epilepsia, los cuales son importantes para el desarrollo de estrategias que permitan la atención integral del paciente con epilepsia, que además de la atención por parte del neurólogo pueda acceder a atención psicológica, grupos de apoyo y educación sanitaria.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es explorar variables psicosociales y culturales que son relevantes en el ámbito colombiano para el tratamiento adecuado de la epilepsia, e incorporarlas al seguimiento farmacoterapéutico dirigido a pacientes con esta condición para establecer estrategias que mejoren el control de las crisis y su calidad de vida (17).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del instrumento

Para establecer las variables psicosociales y culturales relevantes se empleó la metodología Delphi (18). Se envió a los expertos un cuestionario para evaluar la importancia en el ámbito colombiano de las variables psicosociales y culturales que, según la literatura, influyen en el control de las crisis de epilepsia, y que deberían incluirse en el seguimiento farmacoterapéutico de personas con esta condición.

Para evaluar la importancia de dichas variables se empleó una escala de 1 a 5 (1: irrelevante, 5: muy relevante). Se definió que había consenso cuando el 80% de los participantes estaban de acuerdo en incluir una variable (puntuación de 4 ó 5) o para no incluirla (puntajes menores o iguales a 3). Si en la valoración de una variable no se alcanzaba el consenso, ésta se evaluó de nuevo en la segunda ronda.

Una vez identificadas las variables a ser incluidas, fueron diseñadas las preguntas para su evaluación tomando como modelo las encuestas de Conocimientos, Actitudes y Prácticas diseñadas para VIH y la información dirigida a pacientes disponible en la base de datos de experiencias personales de personas con epilepsia, desarrollada por el Health Experience Research Group de la Universidad de Oxford (19 - 22). Estas preguntas fueron incorporadas al método de seguimiento farmacoterapéutico Dáder adaptado a Colombia (23).

Prueba piloto

La primera versión del instrumento fue sometida a una prueba piloto con 21 pacientes con diagnóstico de epilepsia, que llevaran mínimo un mes con tratamiento anticonvulsivante, con edades entre 14

y 60 años, que no hubiesen sido sometidos a cirugía, quienes asistían a consulta de neurología en una institución especializada en la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia.

Durante la aplicación de la encuesta se tomó datos sobre la calidad y utilidad de la información brindada y las actitudes de los pacientes frente a cada una de las preguntas del cuestionario. Con base en esta información se realizó ajustes al formulario y se obtuvo la versión final.

Al mismo tiempo, luego de la aplicación del instrumento se determinó las intervenciones requeridas por los pacientes para la solución de los problemas detectados y se definió su implementación.

Aplicación del instrumento

La versión final del instrumento fue aplicada a 70 pacientes diferentes a los que habían participado en la prueba piloto, que cumplieran con los mismos criterios de inclusión y exclusión y se realizó las intervenciones según los problemas detectados.

Tanto en el transcurso de la prueba piloto como durante la aplicación del instrumento, los pacientes con diagnóstico de epilepsia atendidos por los médicos neurólogos fueron remitidos al consultorio farmacéutico. Los pacientes fueron incluidos en el estudio si aceptaban participar luego de conocer toda la información sobre la investigación y firmar el consentimiento informado. En caso de menores de edad el consentimiento informado fue firmado por sus padres o acudiente. Este estudio contó con el aval del Comité de Ética de la Liga Colombiana Contra la Epilepsia.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de la información cualitativa recopilada se desarrolló en dos fases: en primer lugar, se hizo un análisis univariado para describir los resultados y, en segundo lugar, se aplicó un Análisis de Correspondencias Múltiples (ACM). El análisis de los datos cualitativos se realizó con el software MINITAB 15 para el análisis univariado y para la exploración de correspondencias se empleó el software SPAD 4.51. El manejo y almacenamiento de datos se realizó en el programa Microsoft Excel: Mac® 2008.

RESULTADOS

Diseño del instrumento

En el consenso participaron: un experto en factores psicosociales de la epilepsia (trabajadora social),

3 especialistas en seguimiento farmacoterapéutico (dos farmacéuticos PhD en atención farmacéutica y un médico farmacólogo especialista en la misma área), 2 expertos en temas de estigma y discriminación por condiciones de salud (un antropólogo de la salud y un salubrista público) y un químico farmacéutico especialista en farmacoeconomía.

En la primera ronda se envió el formulario vía correo electrónico, de manera individual a cada uno de los siete expertos (para mantener el anonimato), obteniéndose consenso en la importancia de incluir dentro del seguimiento farmacoterapéutico para pacientes con epilepsia las variables trastornos psicológicos, dinámica de redes sociales y percepción de estigma.

De acuerdo a los comentarios de los expertos se concluyó que la percepción de la enfermedad hace parte de la percepción de estigma, por lo que esta variable no se tuvo en cuenta en la segunda ronda de discusión.

En la segunda ronda se envió, por la misma vía, una consulta puntal sobre las variables en las que no se había obtenido consenso de opiniones en la primera ocasión (estrato socioeconómico y situación laboral). Los expertos estuvieron de acuerdo en incluir la variable situación laboral y resaltaron la importancia de incluir el nivel cultural de los pacientes medido como nivel educativo máximo alcanzado y no a través del estrato socioeconómico.

A partir de estos resultados se diseñó el instrumento de SFT como un cuestionario de preguntas cerradas tomando como base la adaptación a Colombia del método Dáder e incorporando las preguntas sobre los conocimientos de la epilepsia diseñadas y aquellas relacionadas con la situación laboral del paciente, su relación con su familia, amigos y conocidos, la exposición a situaciones de estigma y la planificación del embarazo, presentes en las encuestas CAP de referencia (20, 21).

Prueba piloto

En la prueba piloto participaron 9 mujeres y 12 hombres, la edad promedio fue de 30,1 años (rango 16 - 50 años). Los hallazgos de la prueba piloto permitieron ajustar el instrumento y detectar necesidades recurrentes de información por parte de los pacientes, razón por la cual se implementó actividades de educación sanitaria y se diseñó folletos informativos sobre aspectos básicos de la epilepsia (qué es, causas, manifestaciones, factores desencadenantes y su relación con la paternidad y

la maternidad). Además, se diseñó folletos sobre el uso adecuado de los medicamentos, incluyendo las condiciones de almacenamiento adecuadas, la importancia de cumplir el tratamiento y las señales de alarma de reacciones adversas graves.

Aplicación del instrumento

Se incluyó 70 pacientes, 38 (54,3%) mujeres y 32 (45,7%) hombres, con edad promedio de 26 años (rango 14 - 60 años). Las características sociodemográficas de los pacientes se consignan en la tabla 1. 41 pacientes (58,6%) no tenían hijos y en 32 casos en la familia de los pacientes había alguien más con diagnóstico de epilepsia. 16 pacientes (22,9%) manifestaron haber dejado de asistir alguna vez a consulta médica o de conseguir sus medicamentos por falta de dinero.

Con relación a la situación laboral, de los 50 pacientes mayores de 18 años, 13 (26%) se encontraban dedicados a sus estudios, 15 (30%) se encontraban empleados y 22 (44%) se encontraban desempleados.

Tabla 1. Características sociodemográficas de los pacientes.

Características		n (%)
Género	Masculino	32 (45,7)
	Femenino	38 (54,3)
Edad	Promedio (rango)	26 años (14-60 años)
Estado civil	Casado	22 (31,4)
	Soltero	44 (62,9)
	Divorciado	2 (2,9)
	Viudo	2 (2,9)
Lugar de vivienda	Rural	3 (4,3)
	Pequeño poblado	32 (46,7)
	Ciudad	35 (50)
Régimen de salud	Contributivo	19 (27,1)
	Subsidiado	47 (67,1)
	No afiliado	4 (5,7)
Nivel educativo máximo alcanzado	Ninguna educación	2 (2,9)
	Primaria incompleta	6 (8,6)
	Primaria completa	3 (4,3)
	Secundaria incompleta	26 (37,1)
	Secundaria completa	10 (14,3)
	Estudios técnicos o tecnológicos incompletos	5 (7,1)
	Estudios técnicos o tecnológicos completos	9 (12,9)
	Universidad incompleta	3 (4,3)
Universidad completa	6 (8,6)	

En general, el nivel de conocimientos de los pacientes sobre la epilepsia fue aceptable, las manifestaciones de las crisis tónico-clónicas fueron las más reconocidas, y las causas más mencionadas por los pacientes sobre esta condición fueron las infecciones del sistema nervioso central, los golpes en la cabeza y los factores genéticos. Se encontró que con cierta frecuencia (25,7%) los pacientes creían que la epilepsia es causada por hechizos o posesión de espíritus.

Los factores desencadenantes más reconocidos fueron los malos hábitos de sueño (52; 74,3%), consumo de alcohol (52; 74,3%) y de sustancias psicoactivas como café, cigarrillo y drogas ilícitas (51; 72,9%), las reacciones emocionales fuertes (48; 68,6%), el estrés (58; 82,9%) y los dolores de cabeza incapacitantes (60; 85,7%). Los conocimientos sobre el manejo de los medicamentos fueron buenos, la mayoría de ellos los toman con agua (63; 90%). Las condiciones de almacenamiento de los medicamentos también eran adecuadas en la mayoría de los casos, sólo 9 personas guardaban el medicamento en la cocina o el baño.

Las falencias de conocimientos más relevantes fueron: (a) no todos los pacientes que practican actividades que pueden desencadenar las crisis conocían su efecto; (b) la mayoría de las mujeres desconocían que tanto las crisis como el tratamiento podían representar un riesgo para el bebé y la importancia de planear el embarazo; y (c) los pacientes y sus familiares desconocían las prácticas adecuadas para atender una crisis.

La principal red social de apoyo para los pacientes con epilepsia era su familia. En todos los casos los familiares del paciente conocían su diagnóstico y eran quienes más frecuentemente le apoyaban en su tratamiento. Sólo la mitad de los 32 pacientes que tenían pareja comentaban con el/ella sobre sus crisis y contaban con su apoyo en las actividades relacionadas con el tratamiento y la atención médica de la condición. En la mayoría de los casos, los amigos del paciente conocían su diagnóstico. En el caso de otras redes sociales como los compañeros de estudio y de trabajo se encontró que están poco vinculados en el apoyo del tratamiento.

El 50% de los pacientes consideraba que la epilepsia era una condición que aunque afectaba sus actividades diarias, con algunas precauciones podían desarrollarlas normalmente; 15 (21,4%) consideraron que era una enfermedad que restringía algunas actividades de su vida y 16 (22,9%) que era

una condición que no afectaba sus capacidades y era una persona normal. Sólo 4 personas consideraban que la epilepsia era una enfermedad discapacitante. Asimismo, 37 pacientes (52,9%) consideraron que su estado de salud actual era bueno, 16 (22,9%) que era regular, 6 (8,6%) que era excelente, 5 (7,1%) que era muy buena y 4 (5,7%) que era mala.

Los sentimientos más mencionados por los pacientes fueron la baja autoestima (25; 35,7%), y la vergüenza por la condición (19; 27,1%). Las situaciones de discriminación enfrentadas con mayor frecuencia por los pacientes fueron las murmuraciones (18; 25,7%) y los comentarios de mal gusto sobre la condición (14; 22,9%), la discriminación en servicios de salud y educación, y a nivel laboral fue poco frecuente.

Problemas de necesidad

La mayoría de los pacientes eran tratados con anticonvulsivantes clásicos (ver tabla 2). El uso de anticonvulsivantes de segunda generación (14 pacientes) se relacionó en todos los casos con mal control de las crisis (≥ 1 crisis al mes), en 9 casos un largo tiempo con el diagnóstico (> 5 años) y en un caso por la aparición de reacciones adversas producidas por el medicamento de primera elección.

Tabla 2. Anticonvulsivantes usados por los pacientes.

Fármaco	Pacientes (%)	Fármaco	Pacientes (%)
Carbamazepina	36 (51,4)	Topiramato	2 (2,9)
Fenitoina	16 (22,9)	Clonazepam	2 (2,9)
Lamotrigina	9 (12,9)	Oxcarbazepina	2 (2,9)
Acido valproico	8 (11,4)	Levetiracetam	1 (1,4)
		Fenobarbital	7 (10)

65 pacientes (93%) manifestaron tener acceso a los medicamentos, 34 (52%) de ellos a través de su asegurador (EPS o EPS-S) y 31 los compraban por su cuenta (48%). Los 5 pacientes que no tenían acceso a los medicamentos mencionaron que se debía a que su asegurador los había negado, no contaba con dinero para comprarlos, porque no estaba disponible en la farmacia o porque no contaba con una farmacia cerca de su residencia.

Problemas de efectividad

29 (41,4%) tenían al menos una crisis por año, 23 (32,8%) tenían frecuencia entre 2 y 6 crisis al año y 18 (25,7%) presentaban más de una crisis al mes, pero en este caso se observó que no siempre los pacientes tenían certeza de cuan frecuentes eran sus crisis. Uno de los factores que afectan directamente el control de las crisis son los hábitos de vida desencadenantes de los pacientes; aquellos practicados con mayor frecuencia fueron: malos hábitos de sueño, no comer a la hora acostumbrada, ver televisión a oscuras, el estrés y las preocupaciones.

Problemas de seguridad

41 pacientes (58,6%) presentaron reacciones adversas al medicamento (RAM), las más frecuentes fueron el sueño (28; 40,0%), principalmente al inicio del tratamiento, los cambios de ánimo (7; 10%) y el mareo (6; 8,6%), 6 pacientes manifestaron que la reacción adversa interfería con sus actividades diarias y 8 manifestaron que afectaba la adherencia al tratamiento.

Intervenciones

Para dar solución a los problemas detectados, 5 pacientes (7,1%) fueron remitidos a trabajo social, 26 (37,1%) a psicología, 2 (2,9%) educación especial y 2 al médico neurólogo como consecuencia de reacciones adversas graves. Las intervenciones de educación sanitaria para suplir las deficiencias de información fueron recibidas por todos los pacientes, pues se realizaban al final de la consulta.

Análisis estadístico

En el análisis estadístico se encontró correspondencia entre la afiliación al régimen subsidiado y problemas de acceso a medicamentos, así como correspondencia entre mejor acceso y compra de bolsillo (ver figura 1). De igual manera, se advierte una posible correspondencia entre los sentimientos de vergüenza y baja autoestima con alta frecuencia de las crisis, al igual que entre baja frecuencia de las crisis y pocos sentimientos de autoestima (ver figura 2).

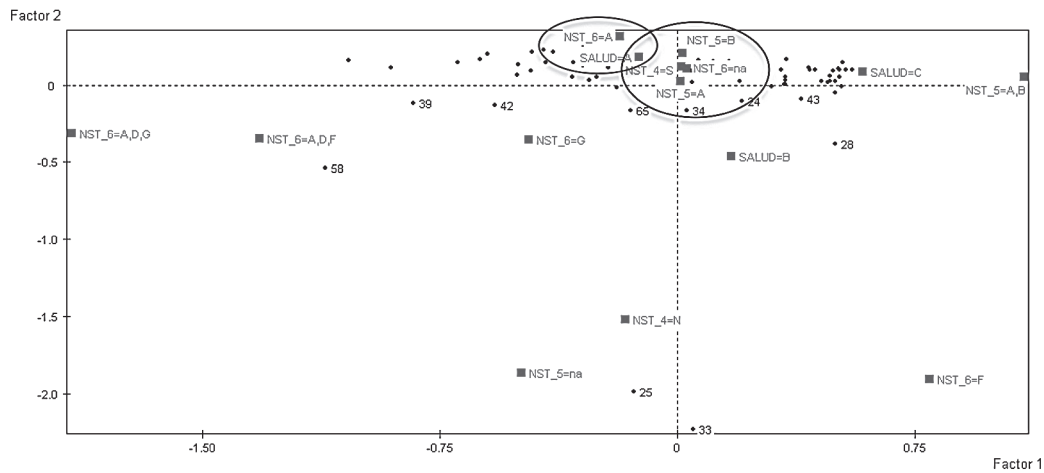


Figura 1. Plano factorial para Variables de necesidad y régimen de salud con individuos. Abreviaturas: **SALUD=A:** Pacientes afiliados al régimen subsidiado; **NST6=A:** El asegurador los negó; **NST 4=S:** Pacientes que tienen acceso a los medicamentos; **NST 5=A:** El asegurador los entrega; **NST5=B:** Compra los medicamentos por gasto de bolsillo.

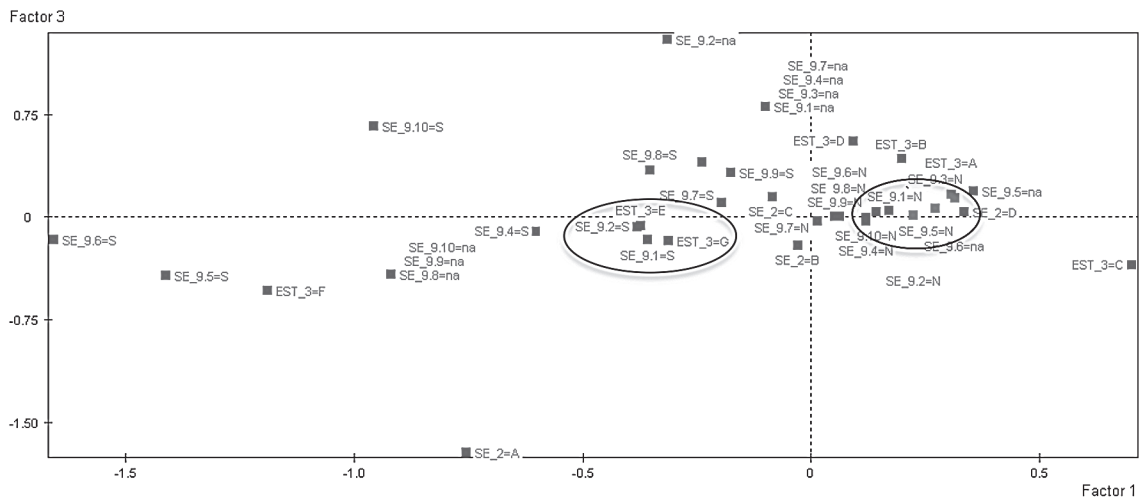


Figura 2. Plano factorial para variables de efectividad, percepción de la enfermedad y problemas psicológicos. Abreviaturas: **SE_9.1=S:** Pacientes que se sienten avergonzados por su condición; **SE_9.2=S:** Pacientes que tienen baja autoestima; **EST_3=E:** Frecuencia de crisis 6 al año; **EST_3=G:** Más de 12 crisis al año; **SE_9.1=N:** Pacientes que no se sienten avergonzados por su condición; **SE_9.2=N:** Pacientes que no tienen baja autoestima; **EST_3=A:** Frecuencia de crisis, menos de 1 al año; **SE_2=D:** Pacientes que consideran que la epilepsia es una condición que no altera sus capacidades y es una persona normal.

DISCUSIÓN

En Colombia el método de SFT más empleado es el Método Dáder, el cual considera 3 tipos de problemas Relacionados con Medicamentos (PRM): de necesidad, de efectividad y de seguridad; no obstante, no considera las variables psicosociales y culturales relacionadas con el paciente (24). Por esta razón, el Grupo de Investigación RAM de la Uni-

versidad Nacional de Colombia hizo una adaptación del método Dáder, con el fin de considerar, además de los PRM ya mencionados, aquellos problemas que se relacionan con el acceso a los medicamentos, propios de la dinámica del sistema de salud colombiano, y un primer acercamiento a la evaluación de la influencia de variables psicosociales sobre el éxito de la terapia farmacológica (23).

Para la definición de las variables psicosociales y culturales a incluir en el instrumento se empleó el método Delphi, dado que este método ha sido utilizado con frecuencia para obtener consensos sobre tópicos específicos de salud de los cuales no existen datos históricos con los que trabajar, y el análisis se basa en la experiencia de los expertos (25, 26). Cabe destacar por tanto, que en este caso se desconocían los factores psicosociales y culturales relevantes para Colombia en el tratamiento de la epilepsia y que los expertos fueron seleccionados considerando su experiencia en el sector sanitario y en el trabajo con personas víctimas de discriminación por su condición de salud, de modo que si bien cada uno de los participantes no era experto en todos los temas, en conjunto abarcaban todos los temas a evaluar.

Por otro lado, las encuestas CAP son herramientas de vigilancia epidemiológica de segunda generación, las cuales emplean datos de comportamiento para informar y explicar tendencias registradas en una población, y a partir de esta información señalar comportamientos específicos que deben ser modificados, permitiendo el diseño de intervenciones novedosas que permitan la solución o prevención de problemas de salud (19).

Se incluyó pacientes mayores de 14 años dado que los estudios disponibles contemplan poblaciones de adolescentes y adultos, y no se incluyó pacientes mayores de 65 años debido a dificultades de comprensión de las personas por su edad. También fueron excluidas las personas que habían sido sometidas a cirugía, pues eran casos críticos de mal control de las crisis, que de acuerdo a la literatura tendrían un alto grado de estigma y que podría generar un sesgo en los resultados del estudio (14).

El desequilibrio entre el nivel de conocimientos de los pacientes sobre la epilepsia (causas, manifestaciones, factores desencadenantes, precauciones del embarazo) y el manejo de los medicamentos coincide con lo descrito previamente por otros estudios (27, 28). Además, se pudo establecer que las necesidades de conocimiento pueden afectar el desempeño de la terapia farmacológica y deberían ser incorporadas en el SFT, pues el desconocimiento de aspectos básicos de la condición puede generar prácticas inadecuadas que ponen en riesgo la integridad del paciente y puede generar actitudes negativas hacia la condición (1, 7, 11, 29).

Se encontró también que el estigma de la epilepsia parece ser menor comparado con otras patologías

que también presentan carga de discriminación como el VIH (30). En efecto, la principal red social de apoyo del paciente es su familia y su pareja, y en algunos casos sus amigos más cercanos. Fue poco frecuente el reporte de la negación de la prestación de servicios de educación e información a los pacientes, así como la discriminación laboral.

Esta última situación podría estar relacionada con el ocultamiento de la condición por parte del paciente a sus jefes y/o compañeros de trabajo, dado que dar a conocer su diagnóstico en el ámbito laboral puede causar al paciente dificultades en la consecución de un trabajo (9, 10). De hecho, en un estudio realizado en Japón se encontró que la tasa de desempleo de las personas con epilepsia es mayor que la de la población general y la pérdida de mano de obra debido al uso incompleto del potencial económico de estas personas es devastadora y se estima que este costo indirecto alcanza al 86% del costo total de la enfermedad (31).

Se confirmó lo documentado en la literatura sobre la relación entre los sentimientos de autoestigma y los problemas emocionales con la frecuencia de las crisis (14, 32); así como la correspondencia entre una buena percepción de la epilepsia por parte del paciente y la baja frecuencia de crisis, considerando que el control de las mismas facilita la interacción con las demás personas, puesto que las crisis no se harán evidentes fácilmente y el riesgo de presentar crisis en público es reducido (12, 13).

El instrumento también puso en evidencia problemas de acceso tanto a los medicamentos como a servicios especializados (p. ej. psicología) debido a las restricciones de cobertura del plan de beneficios del régimen subsidiado y a barreras administrativas impuestas por las EPS. Estas situaciones han sido evidenciadas a nivel nacional por parte de la Defensoría del Pueblo (33).

Finalmente, se debe tener en cuenta que este trabajo presenta algunas limitaciones:

En primer lugar, el trabajo presenta hallazgos de la aplicación del instrumento y aunque permite hacer una descripción de la población con diagnóstico de epilepsia atendida en la Liga Contra la Epilepsia de Cartagena, no es muestra representativa de personas con epilepsia en Colombia.

En segundo lugar, no se contó con información de patologías concomitantes por la naturaleza de la institución (especializada en neurología) lo que en parte refleja el fraccionamiento de los servicios de salud en Colombia y la falta de integralidad de los mismos.

CONCLUSIONES

El instrumento permitió explorar variables psicosociales y culturales en el marco del seguimiento farmacoterapéutico de las personas con epilepsia, detectar problemas relacionados con la terapia y realizar intervenciones para su solución en la población atendida en el trabajo.

Los hallazgos son un primer acercamiento a la descripción de factores psicosociales que afectan el desempeño de la terapia, en especial la dinámica de redes sociales, los problemas emocionales, el nivel educativo máximo y los conocimientos sobre la epilepsia.

Estos factores incorporados en los programas de seguimiento farmacoterapéutico permitirían una atención integral y la conformación de equipos multidisciplinarios con profesionales como psicólogos, educadores especiales y trabajadores sociales.

El instrumento permitió la detección de problemas críticos de acceso a medicamentos y servicios de salud, y la solución de los mismos a través de la Atención Farmacéutica mediante la remisión a trabajo social de la población incluida en el trabajo.

Aunque existe problemas relacionados con las variables psicosociales cuya solución extralimita el alcance de la atención del paciente en la institución de salud, la descripción de los mismos es un aporte a la definición de prioridades en la prestación del servicio de salud.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores agradecen a las entidades financiadoras: Universidad Nacional de Colombia – Dirección de Investigación –Sede Bogotá (Proyecto: DIB: 8003326) y Fundación IFARMA. A la Liga Colombiana Contra la Epilepsia de la Ciudad de Cartagena de Indias, Colombia. A Jorge Espitia por el apoyo en la recolección de datos y a Francisco Acuña por el apoyo en el análisis estadístico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- OMS, OPS, ILAE, IBE. Informe sobre la Epilepsia en Latinoamérica [internet]. Panamá: AG Publicidad 2008 [Citado 2009 Mar 23]. Disponible en: http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/Informe_sobre_epilepsia.pdf
- Carrizosa J. Prevalencia, incidencia y brecha terapéutica en la epilepsia. *Iatreia*. 2007 Sep; 20 (3): 282 - 296.
- McCorry D, Chadwick D, Marson A. Current Drug Treatment of Epilepsy in Adults. *Lancet Neurol*. 2004 Dic; 3 (12): 729 - 735.
- Guerrero R, Gallego AI, Becerril-Montekio V, Vásquez J. Sistema de Salud de Colombia. *Salud Publica Mex*. 2011; 53 (Suppl 2): s144 - s155.
- Colombia, Comisión Reguladora de Salud –CRES. Plan Obligatorio de Salud del Régimen Subsidiado [internet]. POS –S vigente hasta 2009. [Citado 2010 Abr 23]. Disponible en: <http://www.pos.gov.co/Paginas/procedimientosrsr.aspx>
- Colombia, Corte Constitucional Sala Segunda de Revisión Sentencia T-760 de 2008 [internet]. Bogotá, DC, 2008 Jul 38. [Citado 2009 Dic 10]. Disponible en: http://www.esccr-net.org/usr_doc/Sentencia_CC_SALUD_T-760_2008.pdf.
- Baker GA. People with epilepsy: what do they know and understand, and how does this contribute to their perceived level of stigma?. *Epilepsy Behav*. 2002 Dic; 3 (6S2): 26 - 32.
- McCagh J, Fisk JE, Baker GA. Epilepsy, psychosocial and cognitive functioning. *Epilepsy Res*. 2009 Sep; 86 (1): 1 - 14.
- Marinas A, Elices E, Gil-Nagel A, Salas-Puig J, Sánchez JC, Carreño M, et al. Socio-occupational and employment profile of patients with epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2011 Jul; 21 (3): 223 - 227.
- Parfene C, Stewart T, King T. Epilepsy stigma and stigma by association in the workplace. *Epilepsy Behav*. 2009 Ago; 15 (4): 461 - 466.
- Youssef F, Dial S, Jaggernauth N, Jagdeo CL, Pascall A, Ramessar L, et al. Knowledge of, attitudes toward, and perceptions of epilepsy among college students in Trinidad and Tobago. *Epilepsy Behav*. 2009 Jun; 15 (2): 160 - 165.
- Trostle J. Social aspects: stigma, beliefs and measurement. Citado en: Ángel J, Pedley TA. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott–U. E. Raven, 1997. p. 2183 - 2189.
- Fandiño J. La Epilepsia en Colombia: Recuento Histórico, Estado Actual al Principio del Milenio y Visión al Futuro. *Medicina*. 2004 Mar; 26 (64): 28 - 34.
- Senol V, Soyuer F, Arman F, Oztürk A. Influence of fatigue, depression, and demographic, socioeconomic, and clinical variables on quality of life of patients with epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2007 Feb; 10 (1): 96 - 104.
- Loring DW, Meador KJ, Lee GP. Determinants of quality of life in epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2004 Dec; 5 (6): 976 - 980.
- Alanis-Guevara I, Peña E, Corona T, López-Ayala T, López-Meza E, López-Gómez M. Sleep disturbances, socioeconomic status, and seizure control as main predictors of quality of life in epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2005 Nov; 7 (3): 481 - 485.
- Bonal J, Dominguez-Gil A, Gamundi M, Napal V, Valverde E. *Farmacia Hospitalaria: Planificación, Organización, Gestión y Funciones*. 3ª ed. Madrid: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria; 2002. p. 275 - 293.
- Godet M, De la anticipación a la acción. *Manual de prospectiva y estrategia*. 2ª ed. Bogotá: Alfa-Omega; 1995. p. 141 - 145.
- Batista R, Landrove O, Bonet M, Feal P, Ramírez M. Sistema de Vigilancia de Enfermedades No Transmisibles en Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 2000 May-Ago; 38 (2): 77 - 92.
- ONUSIDA, International Planned Parenthood Federation (IPPF), Global Network of People living with HIV/AIDS (GNP+), International Community of Women Living with HIV/AIDS (ICW). Índice de estigma en personas que viven con VIH [internet]. ONUSIDA. 2008. [Citado 2010 Abr 23]. Disponible en: www.stigmaindex.org/download.php?id=27.
- Bogotá, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Programa de Salud sexual y reproductiva. Encuesta para jóvenes –Salud sexual y reproductiva. 2008.
- Health Experience Research Group. *Epilepsy - Health talk online* [internet]. Oxford, Reino Unido. Oxford University, [Actualizado 2008 Feb; Citado 2009 Mar 23]. Disponible en: www.healthtalkonline.org
- López J, Vacca C. Propuesta para la implementación y desarrollo de programas de seguimiento farmacoterapéutico a personas con patologías crónicas. 1ª ed. Bogotá: Departamento de Farmacia Universidad Nacional de Colombia; 2012.
- Silva M, Calleja M, Machuca M, Fernández F, Faus M. Seguimiento farmacoterapéutico a pacientes hospitalizados: adaptación del método Dáder. *Seguim Farmacoter*. 2003 Jul-Sep; 1 (2): 73 - 81.

25. Jensen JL, Croskerry P, Travers AH. Paramedic clinical decision making during high acuity emergency calls: design and methodology of a Delphi study. *BMC Emerg Med* 2009 Sep; 9: 17.
26. Beech B. Studying the future: a Delphi survey of how multidisciplinary clinical staff view the likely development of two community mental health centres over the course of the next two years. *J Adv Nurs*. 1997 Feb; 25 (2): 331 - 338.
27. Coker MF, Bhargava S, Fitzgerald M, Doherty CP. What do people with epilepsy know about their condition? Evaluation of a subspecialty clinic population. *Seizure*. 2011 Enc; 20 (1): 55 - 59.
28. Goldstein LH, Minchin L, Stubbs P, Fenwick PB. Are what people know about their epilepsy and what they want from an epilepsy service related?. *Seizure*. 1997 Dic; 6 (6): 435 - 442.
29. Osungbade KO, Siyanbade SL. Myths, misconceptions, and misunderstandings about epilepsy in a Nigerian rural community: implications for community health interventions. *Epilepsy Behav*. 2011 Ago; 21 (4): 425 - 429.
30. ONUSIDA. Violaciones de los derechos humanos, estigma y discriminación relacionados con el VIH: estudios de caso de intervenciones exitosas [internet]. Ginebra, Suiza: ONUSIDA. 2005 Abr. [Citado 2010 Abr 23]. Disponible en: http://data.unaids.org/publications/irc-pub06/jc999-humrightsviol_es.pdf
31. Begley CE, Famulari M, Anneges JF, *et al*. The cost of epilepsy in the United States: an estimate from populationbased clinical and survey data. *Epilepsia*. 2000 Mar; 41 (3): 342 - 351.
32. Carrizosa J. Estigma en epilepsia. *Iatreia* 2009 Sep; 22 (3): 246 - 255.
33. Colombia, Defensoría del Pueblo. La tutela y el derecho a la Salud Periodo 2006 - 2008 [internet]. Bogotá, Colombia: Defensoría del Pueblo. 2009. [Citado 2010 Abr 23]. Disponible en: http://www.semana.com/documents/Doc-1959_2009924.pdf.

EVALUATION OF THE INDUCTION OF LIPOLYTIC ENZYMES FROM A *Pseudomonas aeruginosa* ISOLATED FROM AFRICAN PALM FRUIT (*Elaeis guineensis*)

EVALUACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS A PARTIR DE UNA *Pseudomonas aeruginosa* AISLADA DEL FRUTO DE PALMA AFRICANA (*Elaeis guineensis*)

Yomaira USCÁTEGUI¹, Carlos JIMÉNEZ-JUNCA¹, Camilo SUÁREZ², Erlide PRIETO-CORREA^{1*}

Received: 03 Juny 2012 Accepted: 18 December 2012

ABSTRACT

Background: Extracellular lipases are found in the culture broth when the fermentation is at the end of the exponential phase. Lipases can be induced easily since they are produced by the presence of oily sources or other materials as surfactants, fatty acids, some esters, glycerol and biliary salts. **Objective:** The aim of this work is to study the effect of carbon source concentration and the use of inductors on biomass production, and the lipolytic activity of a bacterium isolated from mature palm oil fruits. **Methods:** The yield biomass/substrate was evaluated with glucose as carbon source at different concentrations (3, 5, 7, 10, 15 y 20 g/L) by dry weight and OD (600 nm). Lipolytic activity was evaluated by spectrophotometric assay using p-nitrofenilpalmitate at 37°C for 15 min. **Results:** Gram negative microorganisms with lipolytic activity isolated from palm fruit were identified as *Pseudomonas aeruginosa*. The growth of the bacteria was inhibited when glucose was used at concentrations greater than 5%. The production of lipase was induced by using three inducers (Palm oil, Tween 20 and palm oil:Tween 20 mixture), at three different induction times (0, 11 and 18 hours of fermentation). The highest activity (3,81 μ moles/mL*min) was observed when the palm oil:Tween 20 mixture was added at 11 hours of fermentation. The kinetic of p-nitrophenylpalmitate hydrolysis using the supernatant of a culture induced with palm oil:Tween 20 mixture at 11 hours showed the production of p-nitrophenol beyond 300 minutes, with the greatest hydrolysis rate during the first 7 minutes. **Conclusions:** The growth of *P. aeruginosa* was not affected by using glucose as carbon source at concentrations of 3% and 5%. There was a basal level of lipase production without inducer, and greater lipolytic activity was achieved with the addition of inducers. **Keywords:** Lipolytic activity, fatty acids, enzyme induction, hydrolysis.

RESUMEN

Antecedentes: Las lipasas extracelulares se encuentran en los medios de cultivo cuando las células alcanzan el final de la fase exponencial de crecimiento. Las lipasas son fácilmente inducibles, es así como se producen en presencia de fuentes lipídicas u otros materiales como surfactantes, ácidos grasos, algunos ésteres, sales biliares y glicerol. **Objetivo:** El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la concentración de fuente de carbono y el uso de inductores sobre la producción de biomasa, y la actividad lipolítica de una bacteria aislada de frutos maduros de palma de aceite. **Métodos:** Se determinó el rendimiento de biomasa/sustrato utilizando como fuente de carbono glucosa en diferentes concentraciones (3, 5, 7,

¹ Facultad de Ingeniería. Universidad de La Sabana. Chía, Cundinamarca, Colombia.

² Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Antioquia, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: erlide.prieto@unisabana.edu.co

10, 15 y 20 g/L) mediante la técnica de peso seco y densidad óptica (600 nm). La actividad lipolítica fue evaluada con p-nitrofenil palmitato a 37°C por 15 min. Los productos de la reacción se determinaron espectrofotométricamente (410 nm). **Resultados:** Los microorganismos Gram negativos con actividad lipolítica fueron identificados como *Pseudomonas aeruginosa*. El crecimiento de las bacterias fue inhibido cuando la glucosa se utilizó a concentraciones superiores a 5%. La lipasa fue inducida usando tres inductores (aceite de palma, Tween 20 y la mezcla de aceite de palma:Tween 20), en tres tiempos diferentes de inducción (0, 11 y 18 horas de fermentación). La actividad más alta (3,81 $\mu\text{moles/mL}\cdot\text{min}$) se observó cuando se añadió la mezcla de aceite de palma:Tween 20 a las 11 horas de fermentación. La cinética de la hidrólisis de p-nitrofenil palmitato utilizando el sobrenadante de un cultivo inducido con la mezcla de aceite de palma:Tween 20 a las 11 horas presentó producción de p-nitrofenol hasta más allá de 300 minutos, con la mayor tasa de hidrólisis durante los primeros 7 minutos. **Conclusiones:** El crecimiento de *P. aeruginosa* no se vio afectada utilizando glucosa como fuente de carbono en concentraciones de 3% y 5%. Se encontró un nivel basal de producción de lipasa sin inductor y se obtuvo una mayor actividad lipolítica con la adición de inductores.

Palabras clave: actividad lipolítica, ácidos grasos, inducción enzimática, hidrólisis.

INTRODUCTION

Lipases are lipolytic enzymes, classified as carboxylic ester hydrolases (EC. 3.1.1.3) which break ester bounds of acylglycerides by adding a water molecule generating free fatty acids and glycerol. Lipases are versatile and interesting in biotechnology since they catalyze different kind of reactions such as partial or complete hydrolysis of triacylglycerols, along with the esterification, transesterification and interesterification of lipids (1 - 3).

Lipases are used as additives in food, fine chemicals, detergent, waste water treatment, cosmetics, pharmaceuticals, leather processing and biomedical assays. Furthermore, lipases have an important application in the field of bioenergy, especially in biodiesel production, which is an expanding sector, as a result of the worldwide rising demand on the use of renewable energy (3).

Lipases have been found in many species of animals, plants, and microorganisms. A wide range of microorganisms (bacteria, fungi and yeast) can produce lipases with different enzymological properties and substrate specificities. The enzymes from microbial sources are receiving more attention because of their interesting characteristics. Some bacteria produce and excrete lipase that can catalyze the hydrolysis and synthesis of long chain acylglycerol, which can be produced with high regioselectivity, enantioselectivity, under mild conditions, while keeping the stability in organic solvents, and so forth. Amongst bacteria, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*,

Pseudomonas, *Staphylococcus*, *Chromobacterium* spp. and *Serratia* sp. have been exploited for the production of lipases (3 - 5).

The production of microbial lipolytic enzymes is influenced by nutritional and physical-chemical factors. Nutritional factors like carbon and nitrogen sources and the presence of lipids in the culture medium have been studied to improve the enzyme production from different types of microorganisms (6 - 8). Vegetable oils such as soybean, corn, olive, and sunflower, non-metabolizable polysaccharides and carbohydrates have been used as carbon sources (2, 6). The use of different nitrogen sources (peptone, yeast extract, corn liquor, ammonium sulfate, ammonium nitrate) at different concentrations and combinations have shown effects on lipolytic enzymes production (6, 9). On the other hand, when non fatty substances are used as carbon sources the presence of lipids (butter, olive oil, canola oil, fish oil) in culture medium influence the lipolytic activity and production of microbial lipases (10, 11).

Since lipases have diverse properties in accordance with their origin it is not possible to generalize about the favorable conditions to get a great lipolytic activity or high production, so it is necessary to study each source to find the suitable conditions of production (4).

The aim of this work is to study the effect of carbon source concentration and the use of inductors on biomass production, and the lipolytic activity of a bacterium isolated from mature palm oil fruits.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

A gram negative microorganism with lipolytic activity isolated previously from palm fruit oil in this laboratory was used to produce the lipase (12). The stock cultures of the strain were maintained in glycerol (0.5% v/v) at -80 °C. The microorganism was identified with an API® 20 NE - 24 to 48-hour identification of Gram negative non-Enterobacteriaceae characterization kit. The test results were analyzed through apiweb™ software identification.

Culture medium and carbon source

Synthetic medium (MM) was used as production medium, which contained (NH₄)₂SO₄ (0.5% w/v), casein peptone (1.0% w/v), K₂HPO₄ (0.5% w/v), and MgSO₄*7H₂O (0.1% w/v). The initial pH of the medium was adjusted to 7.5 with sodium phosphate buffer 50 mM prior to sterilization. Glucose at concentrations of 3%, 5%, 10%, 15% and 20% (w/v) was used as carbon source in the fermentation broth (MM).

Pre-inoculum and fermentation conditions

Pre-inoculum was prepared by transferring one loopful of cryopreservation culture to a liquid medium consisting of a nutrient broth Tryptic Soy Broth (TSB) (30 g/L) and allowed to grow on a rotary shaker with shaking at 200 rpm and at 37°C for 18 h. This was used as an inoculum which contained approximately 10⁶ cells per mL. For lipase production, conical flasks (100 mL) containing 20 mL MM medium were inoculated with 1% inoculum and incubated on a rotary shaker at 200 rpm and 37 °C for 24 h (13 - 15).

Biomass determination

Cell biomass was determined by measurement of the absorbance of cells at 600 nm, after being centrifuged at 13000g for 20 min and 4°C, washed twice with saline solution 0.85% (w/v) and re-suspended in saline. Dry cell weight was measured by filtering a 25 mL sample through a 0.2 µm Millipore membrane, followed by washing with 50 mL distilled water and drying at 60°C to constant weight. A standard curve (10 OD corresponds to 17.4 g/L dry weight) was used to determine the biomass production during the fermentation.

Effect of lipid and surfactant on lipase production

Several experiments were carried out to determine the inducing effect by adding 0.3 g/L of an oil and a surfactant, namely, crude palm oil, Tween 20 and a Tween 20:Palm oil mixture (4.8:1 v/v). The inducers were added at different times of growth (0, 11 and 18 h) in order to determine the effect of addition time. Samples were taken during the stationary phase after 24 h of growth.

Lipase assays

At the end of fermentation process, the flasks were taken and harvested to measure the lipase activity in the fermented broth: samples were centrifuged at 10,000 rpm for 20 minutes at 4°C and the supernatant was taken to the lipase assay. The spectrophotometric lipase assay was used to determine the lipolytic activity (16). The substrate solution was prepared by mixing 0.5 mL of 100 mM of pNPP in acetonitrile with 2 mL of ethanol and 47.5 mL of phosphate buffer (pH 7.5). The assay mixture consisted of 1.5 mL of substrate solution and 0.5 mL of cell-free supernatant. The assay mixture was incubated at 37°C for 15 min and the p-nitrophenol released was measured at 405 nm in Spectronic-117 spectrophotometer against a control without supernatant. One unit of enzyme is defined as the amount of enzyme liberating 1 µmol of p-nitrophenol mL⁻¹ min⁻¹ under the assay conditions.

RESULTS

Bacterial Strain

The biochemical identification that test showed the isolated Gram negative microorganism with lipolytic activity belongs to the genus and species *Pseudomonas aeruginosa* in a 99.9% accuracy.

Effect of the carbon source concentration

Since there is a relationship between the biomass concentration and lipase production (11, 17), the effect of the carbon source (glucose) concentration was studied. Figure 1 shows the evolution of the *P. aeruginosa* cultures.

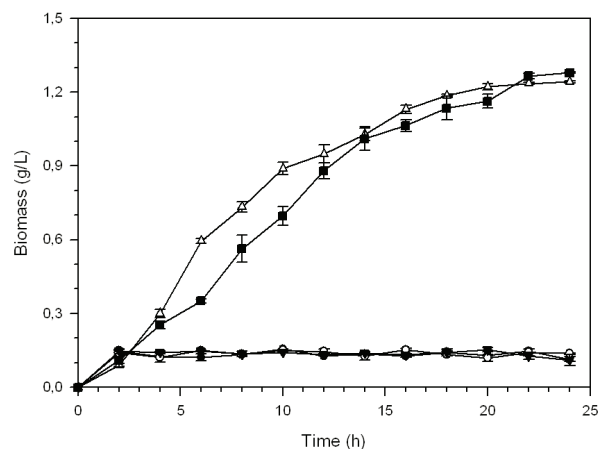


Figure 1. Growth of *P. aeruginosa* in different concentrations of glucose: 3% (Δ), 5% (\blacksquare), 10% (\blacktriangledown), 15% (\circ) and 20% (\bullet). Error bars represent standard error ($n = 3$).

The greatest growth of *P. aeruginosa* was observed when glucose concentration was low (3 and 5 g/L), while the growth was minimum at higher concentrations. Specific growth rate (μ) (Table 1) was similar for concentrations of 3 and 5 g/L glucose but the yield biomass/substrate ($Y_{x/s}$) (at 24 h) was greater for 3 g/L. It is also noted that a concentration of 3 g/L the doubling time (t_d) was lower, so the fermentation is more efficient since the bacteria grow rapidly when the doubling time is low. A concentration of 3 g/L of glucose is used in the rest of this work.

Table 1. Kinetic parameters for the growth *P. aeruginosa* in a MM medium using glucose as carbon source.

Glucose concentration (g/L)	μ (h^{-1})	% $Y_{x/s}$	t_d (h)
3	0.034	73.0	1.26
5	0.033	48.2	1.38

Effect of induction agents

When *P. aeruginosa* was grown using 3 g/L of glucose as carbon source with the inducers added at different times during the fermentation process the lipolytic activity showed distinct values (Figure 2).

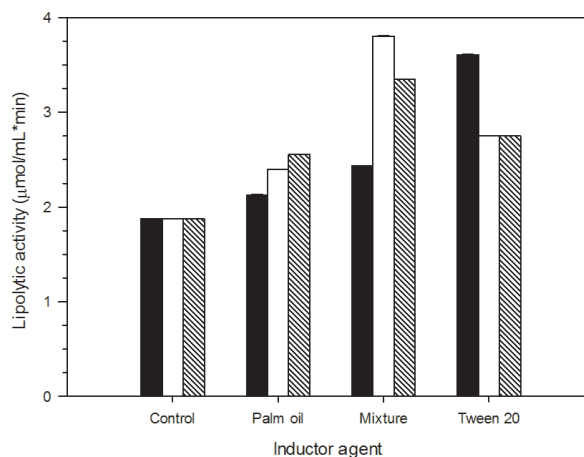


Figure 2. Effect of the inducer agent and induction time on the lipase production in cultures of *P. aeruginosa* grown on 3 g/L glucose. Induction time: 0 h (\blacksquare), 11 h (\square), 18 h (\hbar). Error bars represent standard error ($n = 3$).

Control sample shows *P. aeruginosa* produced lipase ($1.88 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$) when it grew only in glucose (without inducer) and the production was greater when inducers were added at different times. The greatest lipolytic activity ($3.81 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$) was observed with palm oil:Tween 20 mixture added at 11 hours. Greater lipolytic activity was obtained with Tween 20 and the mixture, rather than with palm oil. The addition of the palm oil:Tween 20 induced the highest lipase activity at each time, except at 0 h, when the activity was the greatest by using Tween 20 as inducer agent. There was an increase of lipolytic activity with the induction time when palm oil was added: 2.13, 2.39 and $2.55 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ at 0, 11 and 18 h respectively; however, there was not a clear tendency when other inducers were used.

Kinetic of enzymatic hydrolysis (Figure 3) was determined for palm oil: Tween 20 mixture at 11 h of induction time, which presented the greatest lipolytic activity. It is clear from the figure that there was lipolytic activity beyond 300 min since p-nitrophenol was still produced. A great hydrolysis rate was observed during the first 7 minutes when production of p-nitrophenol increased from 0 to 56.2 mg/L . The production of p-nitrophenol was increasing until 300 min at lower rates until a constant rate tendency is observed.

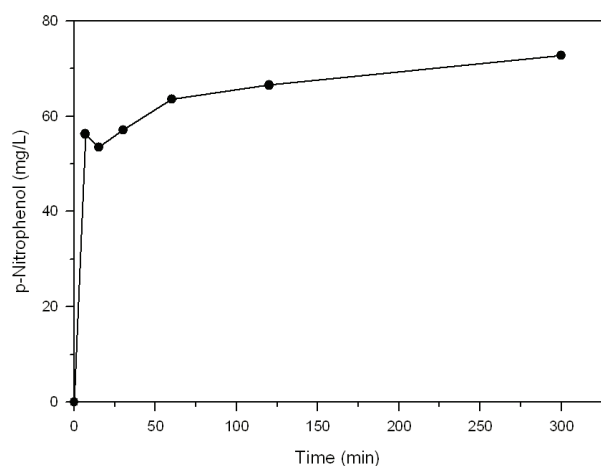


Figure 3. Enzymatic hydrolysis of pNPP using enzymatic extract from a culture induced with palm oil:Tween 20 mixture at 11 hours of induction time.

DISCUSSION

Effect of carbon source concentration

Under the fermentation conditions assayed, bacteria growth in different concentrations of carbon source was evaluated. As observed in Figure 1 there was a cell growth inhibition at higher glucose concentration (above 5 g/L). The concentrations of glucose that favor the obtention of an acceptable growth of *P. aeruginosa* were 3% and 5%. This result agrees with Ito *et al.*, 2001(13), who found that cell growth of *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 was affected by both glucose and ammonium concentration. In the same way, Takac *et al.*, 2008 (18), stated that high concentrations of glucose suppress the lipolytic activity.

On the other hand, Beyenal *et al.*, 2003 (19), and Gupta *et al.*, 2004 (6), pointed out that glucose in small amounts is necessary for the initial growth phase of microorganisms for the releasing of extracellular lipase.

The combination of two types of carbon sources (carbohydrate and oil) does not always improve lipase production. For example Nahas, 1987 (20), working with *R. oligosporus*, and Rapp, 1995 (21), working with *Fusarium* used a mixture of glucose and oleic acid as carbon-source, and it was found that the consumption was produced in a sequential pattern, so the lipase production was repressed by the glucose present in the defined medium.

Effect of induction agents

For lipase production different lipid based carbon sources have been reported as inducer as well as carbon source (alone or in combination with carbohydrates) (1, 10, 18, 22). Results obtained from this study showed that there was lipolytic activity in the control sample without inducer agent. This is known as basal level of the enzyme and it allows concluding that glucose, as carbon source at low concentrations (less than 5 g/L), does not repress the release of the enzyme.

As shown in Figure 2 the inducer agents stimulated the release of enzymes, since all media containing inducer agents showed values greater than $1,88 \mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$, which was the value for the control sample.

The addition of a surfactant (Tween 20) as inducer improved the lipolytic activity regarding with control sample at the three induction times. This result agrees with the studies of Gilbert *et al.* 1991 (23), Nahas, 1987 (20), and Dominguez *et al.*, 2003 (24), who used Tween 20, Tween 80 and Tween 100, finding improvements on lipase production, although the results depended on the type of Tween used. Moreover, Grasian *et al.*, 2008 (5), stated that the addition of any surfactant induces the lipase production. Deive *et al.*, 2009 (11), explains the effect of surfactants on the improvement of lipase production by the solubilization of the lipids on the membrane, forming micelles and extracting membrane proteins (intrinsic and peripheral proteins) which are the responsible proteins of lipolytic activity in membrane bound of microorganisms.

According to Wu *et al.*, 2004 (25), higher levels of lipase production were observed when the substrate formed an emulsion, thereby presenting an interfacial area to the enzyme. This has resemblance with the earlier *P. pseudoalkaligenes* F-111 lipase, where addition of Triton-X-100 increased the alkaline lipase production by 50-fold (26). An elaborated study was performed by Lin *et al.*, 1995, (26) about the effect of Triton-X-100 on lipase production. Triton-X-100 may directly act as a positive activator of lipase gene or may induce the expression of lipase gene by removing the repressor molecules. They also inferred that Triton-X-100 mechanistically promotes both uptake and exit of compounds from the cell through modification of plasma membrane permeability. Contrastingly, the

studies on lipase production by *Staphylococcus* sp. indicated the positive influence of Tween 80 (27).

Favorable levels of lipolytic enzyme production were found in this work when the mixture (Palm oil:Tween 20) was used as inducer agent at 11 hours of growth during the exponential phase. According to Illanes *et al.*, 2008 (4), and Reis *et al.*, 2010 (28), lipases catalyze the hydrolysis of lipidic substrates when they are in micelles, small aggregates or particles in emulsion, because the place where lipolysis occurs requires at least two phases and a larger contact area. On the other hand, Bañó *et al.*, 2003 (29), and Reis *et al.*, 2009 (30), argue that using an emulsion facilitates the interfacial activation of lipases features, as the emulsion facilitates substrate access to enzyme active site.

Bisht *et al.*, 2012 (31), investigated the suitability of adding different carbon sources for lipase production by a mutant strain. Supplementation of production medium with starch tremendously boosted the lipase activity (about 129.3%) as compared to control. Similar results were reported by Pogaku *et al.*, 2010 (27), while investigating the lipase production by *Staphylococcus* sp. Lp12. Rathi *et al.*, 2001 (32), also reported increase in lipase production from *Burkholderia cepacia* in the presence of oil and glucose as sugar additive.

We can use this fact to conclude, that mixture is the best inducer agent compared with the other two, because the activity increment may be due to the presence of more interfacial area, facilitating interaction between enzyme and substrate. Another possibility could be that higher enzyme release was due to the combined effect between palm oil and Tween 20, because the latter one can act separately and facilitate the release of more lipase.

According to previous results, the mixture showed the best results, and for this reason the kinetic of enzymatic hydrolysis was determined with this mixture as shown in Figure 3. The mixture (palm oil:Tween 20) was added to the culture medium at 11 hours of fermentation.

The release of 100 μ M of p-NP was achieved at 300 minutes of reaction with p-NPP when inducer was added at 11 hours of fermentation; this means that when the bacteria was in the exponential phase it was found a greater rate of reaction.

CONCLUSIONS

According to the results, it can be stated that the effect of adding inductors to the fermentation medium increases the levels of enzyme production. Similarly, it was observed that using glucose as carbon source does not suppress the basal level release of the enzyme in the fermentation medium.

Hydrolysis of p-NPP as substrate was determined by the release of p-nitrophenol, acting as an indicator of the presence the enzyme in the medium after 15 minutes of reaction. The reaction showed that an inducing agent stimulated the release of the enzyme into the medium, and the best yield was obtained with mixture (palm oil:Tween 20) as inducer. The mixture was added at 11 hours of fermentation medium and the value was 3,81 μ moles/mL*min for fermentation medium.

A preliminary kinetic study of enzymatic hydrolysis was performed for the best inducer agent (mixture) found. The reaction conditions were: 100 μ M of p-NPP, 300 minutes of reaction, and the inducer was added at 11 hours of fermentation medium. The kinetic of enzymatic hydrolysis for the control sample has lower values than those achieved when the emulsion was used as an inducer in the release of the enzyme.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Colciencias and the Universidad de La Sabana for financing the research project "Obtención de enzimas lipolíticas a partir de microorganismos aislados del fruto de palma aceitera", which is part of this work.

REFERENCES

1. Toscano L, Gochev V, Montero G, Stoytcheva M. Enhanced production of extracellular lipase by novel mutant strain of *Aspergillus niger*. *Biotechnol Biotech Eq.* 2011 Feb; 25 (1): 2243 - 2247.
2. Treichel H, Oliveira D, Mazutti M, Luccio M, Oliveira JV. A Review on Microbial Lipases Production. *Food Bioprocess Tech.* 2010 Apr; 3 (2): 182 - 196.
3. Salihu A, Alam MZ, AbdulKarim MI, Salleh HM. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resour Conserv Recycling.* 2012 Jan; 58 (0): 36 - 44.
4. Illanes A, Álvarez L, Álvaro G. Esterificación quimioselectiva de fitosteroles de madera mediante lipasas. *Rev Col Biotecnol.* 2008 Jul; 10 (1): 17 - 35.
5. Grasian I, Palanichamy E, Austin J, Palanisamy I, Arunachalam P. Investigation of Lipase Production by Milk Isolate *Serratia rubidaea*. *Food Technol Biotechnol.* 2008 Jan-Mar; 46 (1): 60 - 65.

6. Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004 Jun; 64 (6): 763 - 781.
7. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol Adv.* 2009 Nov-Dic; 27 (6): 782 - 798.
8. Li N, Zong M. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. *J Molec Catal B.* 2010 Sep; 66 (1-2): 43 - 54.
9. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv.* 2001 Dec; 19 (8): 627 - 635.
10. Gupta N, Sahai V, Gupta R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochem.* 2007 Apr; 42 (4): 518 - 526.
11. Deive FJ, Carvalho E, Pastrana L, Rúa ML, Longo MA, Sanroman MA. Strategies for improving extracellular lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27. *Bioresour Technol.* 2009 Jul; 100 (14): 3630 - 3637.
12. Peña F. Aprovechamiento de aceites residuales del proceso de fritura como sustrato para el desarrollo de microorganismos productores de lipasas (Proyecto de grado Ingeniero de Producción Agroindustrial). Chia, Colombia: Facultad de Ingeniería Universidad de la Sabana; 2006.
13. Ito T, Kikuta H, Nagamori E, Honda H, Ogino H, Ishikawa H, et al. Lipase production in two-step fed-batch culture of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *J Biosci Bioeng.* 2001; 91 (3): 245 - 250.
14. Gao X, Cao S, Zhang K. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzyme Microb Technol.* 2000 Jul 1; 27 (1-2): 74 - 82.
15. Kanwar L, Goswami P. Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. *Enzyme Microb Technol.* 2002 Nov 1; 31 (6): 727 - 735.
16. Gupta N, Rathi P, Gupta R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Anal Biochem.* 2002 Dec 1; 311 (1): 98 - 99.
17. Lee D, Koh Y, Kim K, Kim B, Choi H, Kim D, et al. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol Lett.* 1999 Oct 15; 179 (2): 393 - 400.
18. Takac S, Marul B. Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008 Sep; 35 (9): 1019 - 1025.
19. Beyenal H, Chen SN, Lewandowski Z. The double substrate growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa*. *Enzyme Microb Technol.* 2003 Jan 2; 32 (1) : 92 - 98.
20. Nahas E. Control of Lipase Production by *Rhizopus oligosporus* under Various Growth Conditions. *J Gen Microbiol.* 1987; 134 (1): 227 - 233.
21. Rapp P. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Enzyme Microb Technol.* 1995 Sep; 17 (9): 832 - 838.
22. Yadav K, Adsul M, Bastawde K, Jadhav D, Thulasiram H, Gokhale D. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. *Bioresour Technol.* 2011 Nov; 102 (22): 10663 - 10670.
23. Gilbert E, Cornish A, Jones C. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J Gen Microbiol.* 1991 Sep; 137 (9): 2223 - 2229.
24. Domínguez A, Costas M, Longo MA, Sanromán A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett.* 2003 Aug; 25 (15): 1225 - 1229.
25. Wu HS, Tsai MJ. Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase. *Enz Microb Technol.* 2004 Dec; 35 (6-7): 488 - 493.
26. Lin SF, Chioul CM, Tsaiz YC. Effect of Triton-X-100 on alkaline lipase production by *pseudomonas pseudoatcatigenes* F-111. *Biotechnol Lett.* 1995; 17: 959 - 962.
27. Pogaku P, Suresh A, Srinivaslu P, Reddy SA. Optimization of lipase production by *Staphylococcus* sp. Lp12. *Afr J Biotechnol.* 2010 Feb 8; 9 (6): 882 - 886.
28. Reis P, Watzke H, Leser M, Holmberg K, Miller R. Interfacial mechanism of lipolysis as self-regulated process. *Biophys Chem.* 2010 Apr; 147 (3): 93 - 103.
29. Bañó M, Gozález H, Abad C. Long-chain fatty acyl-CoA esters induce lipase activation in absence of a water-lipid interface. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jun 10; 1632 (1-3): 55 - 61.
30. Reis P, Holmberg K, Miller R, Leser M, Raab T, Watzke H. Lipase reaction at interfaces as self-limiting processes. *C R Chimie.* 2009 Jan 2; 12 (1): 163 - 170.
31. Bisht D, Kumar K, Singh N. Enhanced Production of Extracellular Alkaline Lipase by an Improved Strain of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 10,055. *Am J Applied Sci.* 2012; 9 (2): 158 - 167.
32. Rathi P, Saxena R, Gupta R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochem.* 2001 Oct; 37: 187 - 192.

LACTIC ACID PRODUCTION VIA CASSAVA-FLOUR-HYDROLYSATE FERMENTATION

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO VIA FERMENTATIVA A PARTIR DE HIDROLIZADO DE HARINA DE YUCA

Joan E. QUINTERO M. Ing.¹, Alejandro ACOSTA C. M.Sc.², Carlos MEJÍA G M.Sc.³,
 Rigoberto RÍOS E. Ph.D.⁴, Ana M. TORRES L. M.Sc.^{5*}

Received: 16 March 2012 Accepted: 17 December 2012

ABSTRACT

Background: Lactic acid (LA) is a carboxylic acid widely used as preservative, acidulant, and/or flavouring in food industry; it is also used as a raw material for the production of lactate ester, propylene glycol, 2,3-pentanedione, propanoic acid, acrylic acid and acetaldehyde. In recent years, the demand for LA production has dramatically increased due to its application as a monomer for poly-lactic acid synthesis, a biodegradable polymer used as a plastic in many industrial applications. LA can be produced either by fermentation or chemical synthesis; the former route has received considerable interest, due to environmental concerns and the limited nature of petrochemical feedstocks; thus, 90% of LA produced worldwide is obtained by fermentation, this process comprises the bioconversion of a sugar solution (carbohydrates) into LA in the presence of a microorganism. **Objectives:** This work is aimed at studying the effect of pH control and culture media composition on the LA production using renewable sources from the agroindustry sector. **Methods:** A *Lactobacillus brevis* strain is used to perform lab scale experiments under aerobic and anaerobic conditions, using three different culture media compositions: a high nutritional content medium (MRS), as a reference, a low nutritional content medium with glucose as the only carbon source (GM), and a potential low nutritional content medium with cassava flour as carbon source (HY1). **Results:** The higher LA production is accomplished under anaerobic conditions, 17.6 ± 0.1 , 12.6 ± 0.2 y 13.6 ± 0.2 g LA/L, for MRS, GM and HY1 medium, respectively. The effect of pH on LA biosynthesis in a 5L bioreactor is also studied using the HY1 medium. For a fermentation time of 120 h, the highest LA concentration obtained was 24.3 ± 0.7 g LA/L, productivity 0.20 g/L/h, $Y_{p/s}$ 0.32g LA/g syrup, at pH 6.5. **Conclusions:** These results are comparable with those using expensive carbon sources such as glucose, and show cassava flour as a promising low-cost substrate source for lab and eventually large scale LA biosynthesis.

Keywords: Lactic acid, cassava flour, cassava waste material, *Lactobacillus brevis*, pH effect.

¹ Estudiante de Maestría en Ingeniería Química del Grupo Biotransformación. Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Profesor ocasional e Investigador Grupo Biotransformación. Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

³ Profesor vinculado y Coordinador del Grupo Biotransformación. Escuela de Microbiología. Bioprocesos. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

⁴ Profesor vinculado e Investigador Grupo Bioprocesos. Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

⁵ Profesor ocasional e Investigador Grupo Bioprocesos. Programa de Bioingeniería. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: atorres@udea.edu.co

RESUMEN

Antecedentes: El ácido láctico (AL) es un ácido carboxílico utilizado en la industria alimentaria como conservante, acidulante y saborizante; también es usado como materia prima para la producción de éster de lactato, propilenglicol, 2,3-pentanodiona, ácido propanoico, ácido acrílico y acetaldehído. La demanda de AL ha aumentado debido a su aplicación como monómero en la síntesis de ácido poli-láctico, un polímero biodegradable usado como plástico en aplicaciones industriales. El AL puede ser producido por fermentación o síntesis química; la primera ruta ha recibido mayor interés, debido a las preocupaciones ambientales y a la limitación en materias primas petroquímicas. El 90% del AL producido en el mundo se obtiene por fermentación, la cual involucra la bioconversión de una solución de azúcar en AL, en presencia de un microorganismo. **Objetivos:** En este trabajo se evalúa el efecto del pH y de medios de cultivos sobre la producción de AL a partir del cultivo de *Lactobacillus brevis*, usando fuentes renovables provenientes del sector agroindustrial. **Métodos:** El desarrollo experimental a escala de laboratorio considera la evaluación de tres medios de cultivo: uno de alto contenido nutricional (MRS), medio de referencia, uno de medio contenido nutricional, con glucosa como única fuente de carbono (GM), y un medio de cultivo de bajo contenido nutricional, con jarabe de yuca como fuente de carbono (HY1). **Resultados:** La más alta producción de AL se obtiene bajo condiciones anaeróbicas, $17,6 \pm 0,1$, $12,6 \pm 0,2$ y $13,6 \pm 0,2$ g AL/L, para los medios MRS, GM y HY1, respectivamente. El trabajo contempla el estudio del efecto del pH sobre la biosíntesis de AL en reactor de 5L, usando el medio de cultivo HY1. Para 120h de cultivo la más alta concentración de AL que se obtiene es $24,3 \pm 0,7$ g AL/L, productividad $0,20$ g/L/h, y un rendimiento de sustrato en producto ($Y_{p/s}$) de $0,32$ g AL/g jarabe, a pH 6,5. **Conclusiones:** Estos resultados son comparables con los obtenidos en otros trabajos usando glucosa como fuente de carbono, y permiten considerar al jarabe de yuca como un potencial sustrato de bajo costo y alta disponibilidad para la producción de AL a escala de laboratorio, y eventualmente a escala industrial.

Palabras clave: Ácido láctico, jarabe de yuca, sustratos económicos, *Lactobacillus brevis*, efecto del pH.

INTRODUCTION

Organic acids production has become a valuable and economic alternative to chemical synthesis, thus contributing the biotechnological world market with carboxylic acids, enols, sulfonic acids, mercapto-compounds, and phosphonic acids.

Biotechnological processes use renewable resources, such as silage, grains, syrups, molasses, and cheese whey as feedstock. Moreover, the products from fermentation have a higher safety degree, which is significant to human health. Some organic acids cannot or are difficult to be produced via chemical synthesis. Taking lactic acid as an example, the chemical synthesis produces a racemic mixture of lactic acid (L and D-forms) while fermentation can selectively synthesize the desired stereospecific lactic acid (1).

Among others, the major applications for organic acids have traditionally been food, beverage, pharmaceuticals, cosmetics, detergents, plastics and resin industry. Organic acids are considered important as starting materials, mainly due to their characteristic functional groups; though for some organic acids the actual market is relatively small, the novelty

of economical production processes would create new markets by providing new opportunities for the chemical industry (2). Lactic acid (LA) was the first organic acid to be produced at industrial scale in 1880. Recently, LA demand has dramatically increased for poly-lactic acid production, where it is used as a monomer (3, 4).

The organic acid production has been traditionally carried out by solid-state fermentation, surface fermentation and submerged fermentation (5-7). The organisms traditionally used in fermentation processes are gram-positive bacteria belonging to the species *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Tetragenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Esterococcus*, *Aerococcus* and *Weissellas* (8, 9). For a lactic acid strain to be considered as prominent it is required to strength its metabolic capabilities, to rapidly and completely convert cheap raw materials into LA with minimal nutritional requirements, and also providing high yields of the preferred stereoisomer without by-product formation (10).

Polymer producers, and industrial users in general, commonly require large quantities of relatively low-cost LA. Therefore, raw materials for LA pro-

duction should be cheap, have low levels of contaminants, be able to induce the synthesis of few or no by-product formation, have ability to be fermented with little or no pretreatment, and have year-round availability. An alternative for LA production would be the use of refined materials. Nonetheless, the economical balance is unfavorable since refined substrates are extremely expensive, causing even higher production costs. Hence, research aiming to screen for cheaper raw materials for economic LA production is a very active field (10). In this regard, diverse sources such as soybean (11), potato (12), wood (13), corn liquor (14), and molasses have been studied. Among these, starchy (mainly sweet sorghum, wheat, corn, cassava, potato, rice and barley), and cellulosic materials, are widely preferred due to their low price, abundance and renewable characteristics (10). Despite the number of nitrogenous materials (whey permeate, yeast extract, malt sprouts, grass extract, peptones, beef extract, casein hydrolysate with supplementation of vitamins) that have been used to supplement the carbohydrate source for fast and heavy growth, yeast extract seems to be the most effective supplement (15).

For experimental studies, LA production is commonly carried out in erlenmeyers or lab scale batch bioreactors. Environmental conditions are usually set at 30 - 42°C, 120 - 200 rpm, and pH ranging from 5 to 6.8 (16). Regarding the operation mode for LA production, batch, fed-batch, repeated batch, and continuous fermentations are the most frequently used. Commonly, higher LA concentrations are obtained in batch and fed-batch cultures, whereas a continuous process may render in a better productivity. Combining either batch or continuous processes with cell-recycling brings on even higher cell concentration and productivity (12).

This work aims at testing the use of cassava syrup as a potential unique carbon source for high-yield LA biosynthesis in a lab scale bioreactor, using *Lactobacillus brevis*. The study did also consider the important effect of pH on LA production by controlling pH culture conditions throughout the entire fermentative process.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and culture medium

A *Lactobacillus brevis* strain was used. Cryogenic vials with MRS medium (in g/L): glucose

100, peptone 10, yeast extract 10, meat extract 10, K_2HPO_4 2, sodium acetate 5, ammonium citrate 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05 and 30% glycerol, were used for strain conservation at -4°C. Chemicals for MRS medium were from MERCK® (Frankfurt, Germany). The strain was maintained in Petri dishes with MRS medium and 1% agar at 4°C, and subcultured every other month.

For flask assays, inoculum preparation was carried out using MRS medium with a modified glucose concentration at 10 g/L. Inoculums for bioreactor operation were grown in the HY medium (in g/L): reducing sugars from enzymatic hydrolysis of cassava flour 30, yeast extract 15, KH_2PO_4 5.6, K_2HPO_4 4.16; initial pH set at 5.5. Operating conditions for inoculums were set at 38°C and 150 rpm for 24 h. For enzymatic hydrolysis of cassava, 0.13 g/L of CaCl were added to a 30% cassava solution. pH was adjusted at 5.5. Afterwards, 0.5 mL/L of Thermamil were added; temperature and stirring were set at 80°C and 500 rpm, respectively. After cooling to 50°C, and adjusting pH at 4.5, 1.5 mL/L of amyloglucosidase was added and the solution heated until 60°C, stirred at 150 rpm during 6h. After filtration, a 242 g/L solution of reducing sugars was obtained, having 76% of glucose (17).

In addition to the MRS medium, two culture media for LA production were used for flasks assays, the GM medium (in g/L): glucose 100, yeast extract 15, KH_2PO_4 5.6, K_2HPO_4 4.16, and the HY1 medium: reducing sugars from enzymatic hydroxylation of cassava flour 100, yeast extract 15, KH_2PO_4 5.6, K_2HPO_4 4.16; initial pH was set at 5.5. For bioreactor operation, the HY1 medium was used. Yeast extract was from OXOID® (Hampshire, England); glucose, KH_2PO_4 and K_2HPO_4 were from MERCK® (Frankfurt, Germany).

Lactic Acid production

Cultivation procedure

Aerobic and anaerobic culture conditions were used for studying the strain ability for LA production. The MRS, GM and HY1 media were tested for the production of LA in flasks of 100 mL with 50 mL of culture medium operating at 38°C, 150 rpm for 72h. For studying LA biosynthesis under anaerobic conditions, a low flow rate nitrogen stream was fed during 2 min after inoculation. Flasks were immediately sealed using rubber stoppers to ensure that cultures were not oxygen-contaminated.

In order to study the pH effect on LA biosynthesis, a 7.5L bioreactor BioFlo/CelliGen 115-New Brunswick® (Enfield CT, EEUU) was used. Operating conditions were set at 38°C, 200 rpm for 76h. Inoculum preparation consisted of 490 mL HY. For pH control NaOH 2N and H₃PO₄ 8.5% solutions were used. The pH effect on LA biosynthesis was studied at three levels: 4.5, 5.5 and 6.5. Results were compared with those from experiments carried out without pH control. In addition to LA production and pH level on-line determination, reducing sugar content was also measured.

Analytical Methods

Determination of reducing sugar was performed by the DNS method, as described elsewhere (18). LA was measured by HPLC AGILENT TECHNOLOGY® (EEUU) using a C-610H column with 7.8 mm ID and 30 cm length; H₃PO₄ at 0.1% and 0.5ml/min as the mobile phase, UV detection at 210 nm, and 30°C (19).

Statistical Analysis

Assays for LA production were run in triplicate. For studying the effect of pH on LA biosynthesis the experiments in a 5L bioreactor were run in duplicate, as well. Thus, a total of three or two values per set of experiments were used to calculate mean and variance for each data point. Substrate and product concentrations were expressed as the mean value \pm standard deviation.

RESULTS

Lactic Acid Production under aerobic and anaerobic conditions

For the purpose of this work, a *Lactobacillus brevis* strain was used; table 1 shows values for LA production. Although the highest LA content was achieved under anaerobic conditions, statistical significance ($P < 0.05$) was only found for the GM culture medium, when comparing the effect of presence or absence of oxygen in the same medium. Similarly, statistical significance was found when comparing anaerobic LA production in the three evaluated culture media.

Table 1. LA biosynthesis at laboratory scale using *Lactobacillus brevis* strain.

Lactic Acid Concentration (g/L)					
ANAEROBIC			AEROBIC		
MRS	GM	HY1	MRS	GM	HY1
17.6 \pm 0.1	12.6 \pm 0.2	13.6 \pm 0.2	15.0 \pm 1.1	5.6 \pm 0.6	12.8 \pm 1.2

Based on these results and taking into account the nutritional requirements of *Lactobacillus* strains, the medium HY1, with cassava flour as carbon source, was selected for further experiments at bioreactor scale.

pH control effect on LA biosynthesis

LA biosynthesis is strongly influenced by pH control. According to Adamberg *et al.*, 2003 (20), pH levels should not exceed values around 4-7. LA biosynthesis at bioreactor scale with no pH control, rendered a poor yield, $Y_{P/S} = 0.24$, productivity: 0.12 g/L.h and a low concentration of LA 9.55 ± 1.50 g/L, compared to that of erlenmeyer, 13.60 ± 0.20 g/L at the same culture conditions (medium HY1, $T = 38^\circ\text{C}$, initial pH: 5.6). The differences between these results are, eventually, not only a scale difference effect but also the effect of a modified composition in the medium for inoculum preparation, using a rich medium (MRS) at erlenmeyer scale, and a poorer medium (HY1) at reactor scale.

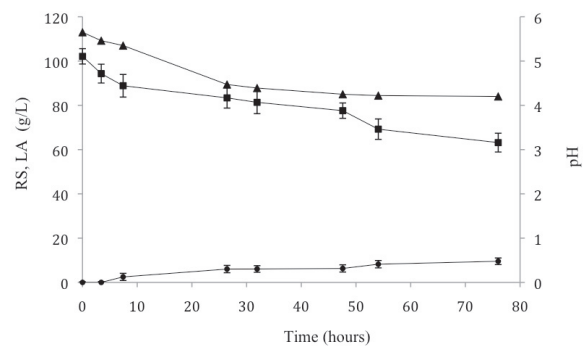


Figure 1. Time-dependent substrate concentration profiles for RS (\blacktriangle), lactic acid LA ($=$), and pH (p) during a 5-L bioreactor fermentation using a *Lactobacillus brevis* strain.

As it is observed in figure 1, while substrate is consumed at the beginning of the fermentation, LA biosynthesis takes 5h to start being accumulated, perhaps due to the lag period that the organism needs to get comfortable with the new environment. After 48h of cultivation, pH stabilizes around 4.2.

Figures 2 and 3 disclose the time variation for substrate and LA concentration, in fermentations carried out in a 5L bioreactor with pH control. As it is shown, the higher the pH, the higher the LA accumulation and a corresponding lower residual substrate concentration; thus, for pH controlled at 4.5, 5.5 and 6.5, LA production reached concentrations of 6.58 ± 1.37 , 12.88 ± 1.50 and 15.43 ± 1.36 g/L, respectively.

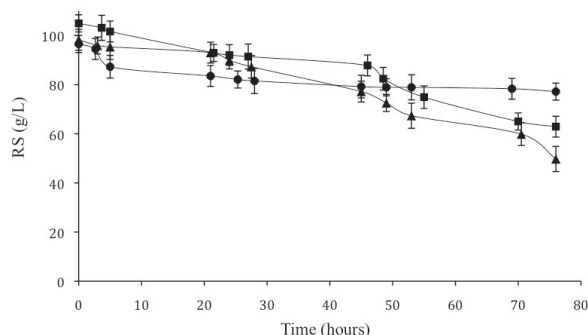


Figure 2. Reducing sugar concentration profiles for a *Lactobacillus brevis* fermentations in a 5-L bioreactor with pH control at 4.5 (\square), 5.5 (\triangle) and 6.5 (\circ).

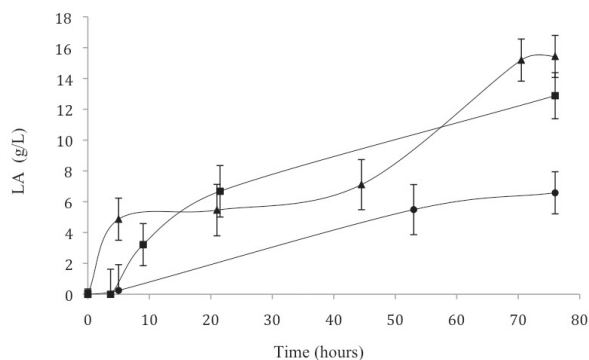


Figure 3. LA accumulation profiles for fermentations with *Lactobacillus brevis*, in a 5-L bioreactor with pH control at 4.5 (\square), 5.5 (\triangle) and 6.5 (\circ).

After running a t-student test, it was found that there was no statistical significance ($P > 0.05$) by comparing LA concentration reached after a fermentation process with pH control at 5.5 and 6.5. Conversely, lower pH conditions (4.5) did result in a reduction of LA accumulation; both, pH values of

4.5 and 5.5, and, 4.5 and 6.5 did render a statistical significance ($P < 0.05$).

Table 2 summarizes the changes in product biosynthesis and reducing sugar (RS) consumption for different pH control levels. As it is observed, there is a major shift in LA accumulation when pH control is raised from 4.5 to 5.5, producing a nearly threefold higher LA concentration.

Table 2. Experimental results for fermentations with a *Lactobacillus brevis* strain in a 5L bioreactor for 76h cultivation.

pH	LA (g/L)	RS _{consump} (g/L)	Y _{p/S}	Productivity (g/L.h)
4.5	6.58±1.37	19.32±4.91	0.34	0.0866
5.5	12.88±1.50	42.03±5.49	0.31	0.169
6.5	15.43±1.36	48.52±6.47	0.35	0.203

Due to pH control in the fermentation process, at pH 6.5, LA biosynthesis increased 61.6%, and Y_{p/S} and productivity were 45.4% and 69%, respectively, higher than those with no pH control.

According to figure 3, LA accumulation profiles still show product biosynthesis activity at the 76th hour of cultivation; this might be the result of a scarce inoculum concentration and/or insufficient fermentation time for total substrate consumption. Therefore, in order to assess this hypothesis further experimentation was undertaken, increasing inoculum concentration in the HY culture medium in a 50%, and incubated at 28°C for 24h. Afterward, the 5L reactor was inoculated and the fermentation was extended until the 120th hour with pH controlled at 6.5. See figure 4.

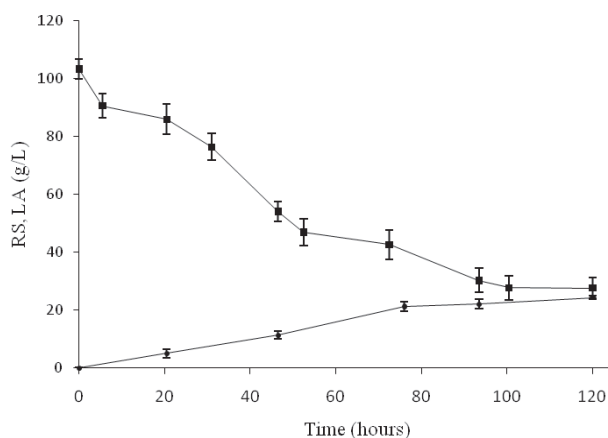


Figure 4. Time-dependent substrate concentration profile for reducing sugars RS (\triangle), lactic acid LA (\square) at pH 6.5, during a 5-L bioreactor fermentation using a *Lactobacillus brevis* strain.

LA accumulated mostly during the first 76 hours of cultivation, with no significant increment between the 76th and 120th hour. The largest LA accumulation, reached at 120h, was 24.3 ± 0.7 g/L; however, the concentration of LA obtained at the 76th hour with no inoculum concentration increment (15.43 ± 1.36 g/L), was lower than that reached at the same time of cultivation with increased inoculum concentration (21.23 ± 1.67 g/L); therefore, the improvement in LA biosynthesis was clearly the result of increasing inoculum concentration rather than enlarging time of cultivation.

DISCUSSION

The genus *Lactobacillus* has been widely known as the major LA producer strain. These organisms have limited ability for synthesizing their own growth factors, mainly B vitamins and aminoacids. Typically, they require carbon and nitrogen sources and diverse elements in the form of carbohydrates, aminoacids, vitamins and minerals. In addition, the use of assortments of aminoacids, peptides and amides, stimulate growth of lactic acid bacteria (LAB) yielding much higher values than those obtained with free aminoacids. LAB growth is also influenced by fatty acid and phosphate which are the most important salt in the LA fermentation. For most lactic strains, ammonium cannot serve as the only nitrogen source; yet, they apparently have shown some influence on amino acid metabolism. Conversely, the amount of minerals found in commercial complex media seems to be sufficient for LA metabolism (10).

Taking into consideration all the aforementioned, it can be stated that cassava flour, the main component for the HY1 medium, became an appropriate substrate for LA biosynthesis. According to Cardona *et al.*, 2011 (21), cassava flour has 81.48% of starch. When 300g/L of cassava flour are prepared, 99% of starch is hydrolyzed reaching a glucose content of about 76%; the remaining part is maltodextrines. Based on this analysis, and besides reducing sugars, cassava flour has different ions including sodium, calcium, iron and magnesium, aminoacids and proteins that might have favored bacterial growth and product biosynthesis.

Even though *Lactobacillus* is a facultative anaerobic organism, its metabolic activity is enhanced in the absence of oxygen, among other factors, by the need

of the oxidized form of the cofactor NAD^+ , which is reduced during the catabolic activity. The NADH donates its extra electrons to the pyruvate molecule formed during glycolysis; since the NADH has lost electrons, NAD^+ regenerates and is again available for glycolysis (16). Yet, as a facultative anaerobic bacterium, *Lactobacillus* is able to ferment and also experience cellular respiration when oxygen is present; the process is called heterofermentative LA biosynthesis; in such a case, carbon dioxide and ethanol are present, thus rendering a LA yield reduction (22).

Conversely, though LAB is acid-tolerant, it has been shown that the pH is an important factor in acid fermentation including lactic acid (23). Different pH values in the medium did influence not only the cell growth but the biosynthesis rate. Moreover, variability in the medium pH might have stimulated a metabolic shift, a theme that merits further experimental evidence.

LA concentration reached in this study is comparable with most literature reports. For substrates such as glucose, corn flour, sawdust, molasses, whey, among others, LA production ranges from 1 to 100 g/L, using commercial strains such as *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, among others (16). Siebold *et al.*, 1995 (14), and Kious *et al.*, 2000 (24), did report LA production close to 26.8 - 27.8 g/L and 13.3 - 19.6 g/L, respectively, using glucose as the unique substrate. The present study reports production of LA close to 24.3 ± 0.7 g/L using an inexpensive substrate with low salt content, and what is most relevant, with a non-commercial strain.

CONCLUSIONS

It was demonstrated that LA biosynthesis can be accomplished competitively using alternative low-cost nutrient-rich substrates such as cassava flour. This kind of substrates show high nutrient and reducing sugar content as well as calcium and aminoacids, all of them available for the fermentative process.

Since *Lactobacillus* is able to ferment and also experience cellular respiration, in the presence of oxygen, carbon dioxide and ethanol were also synthesized, thus provoking a LA titer reduction; therefore, the largest LA accumulation was attained under anaerobic conditions. LA titers, reached in this study, were comparable to most literature

reports, even those using refined and substantially more expensive substrates as unique carbon source.

LA biosynthesis was also dependant on pH control, since a strict control of pH level close to 6.5 rendered a 65% increment in LA accumulation, weighed against lower pH values. The larger LA accumulation might be the result of a metabolic shift at pH values above 6. This argument entails more detailed experimental support; work currently in progress.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Comité para el desarrollo de la investigación – CODI Universidad de Antioquia for financial aid: Project MC07-01-13.

REFERENCES

- De Lima C, Coelho F, Contiero J. The Use of Response Surface Methodology in Optimization of Lactic Acid Production: Focus on Medium Supplementation, Temperature and pH Control. *Food Technol Biotechnol.* 2010; 48 (2): 175 - 181.
- Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* 2008 Feb; 26(2):100-108.
- Mohamed A, Yukihiko T, Kenji S. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *J Biotechnol.* 2010 Dec 20; 156 (4): 286 - 301.
- Harrington T, Hossain Md. Extraction of lactic acid into sunflower oil and its recovery into an aqueous solution. *Department of Chemical and Materials Engineering.* 2008 Jan 5; 218: 287 - 296.
- López C, Zuluaga A, Herrera S, Ruiz A, Medina V. Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche. *Rev Dyna.* 2006 Nov; 73 (150): 39 - 57.
- Gil R, Domínguez R, Pacho J. Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. *Tecnolog Ciencia.* 2008; 23 (2): 79 - 90.
- Darouneh E, Alavi A, Vosoughi M, Arjmand M, Sifkordi A, Rabaji R. Citric acid production: Surface culture versus submerged culture. *African Journal of Microbiology Research.* 2009 Sep; 3 (9): 541 - 545.
- Sneath P, Bergey's. *Manual of systematic bacteriology.* Williams and Wilkins Baltimore. London. 1984; Vol. II: 464.
- Hofvendahl K, Hhanhägerdal H. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resource. *Enzyme Microb Tech.* 2000 Feb 1; 26 (2-4): 87 - 107.
- Young-Jung Wee, Jin-Nam Kim, Hwa-Won Ryu. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technol Biotechnol.* 2006; 44 (2): 163 - 172.
- Kwon S, Lee P, Lee E, Chang Y, Chang N. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. *Enzyme Microbiol Tech.* 2000 Feb 1; 26 (2-4): 209 - 215.
- Anuradha R, Suresh A, Venkatesh K. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. *Process Biochem.* 1999; 35: 367 - 375.
- Moldes A, Alonso J, Parajó J. Resin selection and single-step production and recovery of lactic acid from pretreated wood. *Appl Biochem Biotechnol.* 2001 Aug; 95 (2): 69 - 81.
- Siebold M, Frieling P, Joppien R, Rindfleisch D, Schügerl K, Röper H. Comparison of the production of lactic acid by three different lactobacilli and its recovery by extraction and electrodialysis. *Process Biochem.* 1995; 30 (1): 81 - 95.
- Narayanan N, Roychoudhury P, Srivastava A. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electro J Biotechnol.* 2004 Aug 15; 7 (2): 167 - 179.
- Serna L, Rodríguez A. Producción Biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. *Cienc Tecnol Aliment.* 2005; 5 (1): 54 - 65.
- Rios O, Castaño H. Escalado del proceso de producción de jarabes glucosados en un reactor Batch de 5 a 500 litros como etapa previa a la fermentación etanólica a partir de harina de yuca [Tesis de pregrado]. [Medellín, Colombia]: Universidad de Antioquia: 2009. 48p.
- Breuil C, Saddler J. Comparisons of 3,5-dinitrosalicylic acid and nelson-somogyi methods of reducing sugars and determining cellulose activity. *Enzyme Microb Technol.* 1984; 7: 327 - 332.
- Hussain M, Rouch D, Britz M. Biochemistry of non-starter lactic acid bacteria isolate *Lactobacillus casei* GCRL163: Production of metabolites by stationary-phase cultures. *Int Dairy J.* 2009; 19 (1): 12 - 21.
- Adamberg K, Kask S, Laht T, Paalme T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *Int J Food Microbiol.* 2003 Aug 15; 85 (1-2): 171 - 183.
- Cardona M, Agudelo L. Producción de Biopolímeros (Poli-hidroxialcanoatos) a partir de una cepa comercial empleando sustratos no convencionales [Tesis Maestría en Ingeniería]. [Medellín, Colombia]: Universidad de Antioquia; 2011. 50p.
- Thomas T, Ellwood D, Longyear V. Change from homo- and heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. *J Bacteriol.* 1979 Apr; 138 (1): 109 - 117.
- Silva E, Yang S. Kinetics and stability of a fibrous-bed bioreactor for continuous production of lactic from unsupplemented acid whey. *J Biotechnol.* 1995 Jul 15; 41 (1): 59 - 70.
- Kious J. *Lactobacillus* and lactic acid production [Tesis]. [Golden, Colorado]: Le Tourneau University; 2000. 32 - 33 p.

EVALUADORES

El Comité Editorial expresa sus agradecimientos a todas las personas que colaboraron en la evaluación de los manuscritos puestos a consideración para ser publicados en la Revista Vitae Volumen 19 N° 3.

Ana Torrado

Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de
Vigo
Vigo, España

Félix Andueza

Universidad de los Andes
Mérida, Venezuela

Fernando Ramos

Facultad de Farmacia, Universidad de Coimbra
Coimbra, Portugal

Héctor Suarez Mahecha

ICTA, Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, Colombia

Iván André Torres Marquina

Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo
Cajamarca, Perú

Juan Diego Torres Oquendo

Facultad de Química Farmacéutica, Universidad
de Antioquia
Medellín, Colombia

José Julian López

Departamento de Farmacia, Universidad
Nacional de Colombia
Bogotá, Colombia

Laura M. Castañeda Sandoval

Escuela de Microbiología, Universidad de
Antioquia
Medellín, Colombia

Ligia Luz Corrales

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional
Autónoma de México
Cuernavaca, México

Marcela Longhi

Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias
Químicas, Universidad Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina

Pedro Armando

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad
Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina

Sonia Uema

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad
Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina

William Albarracín

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad
Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina