



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

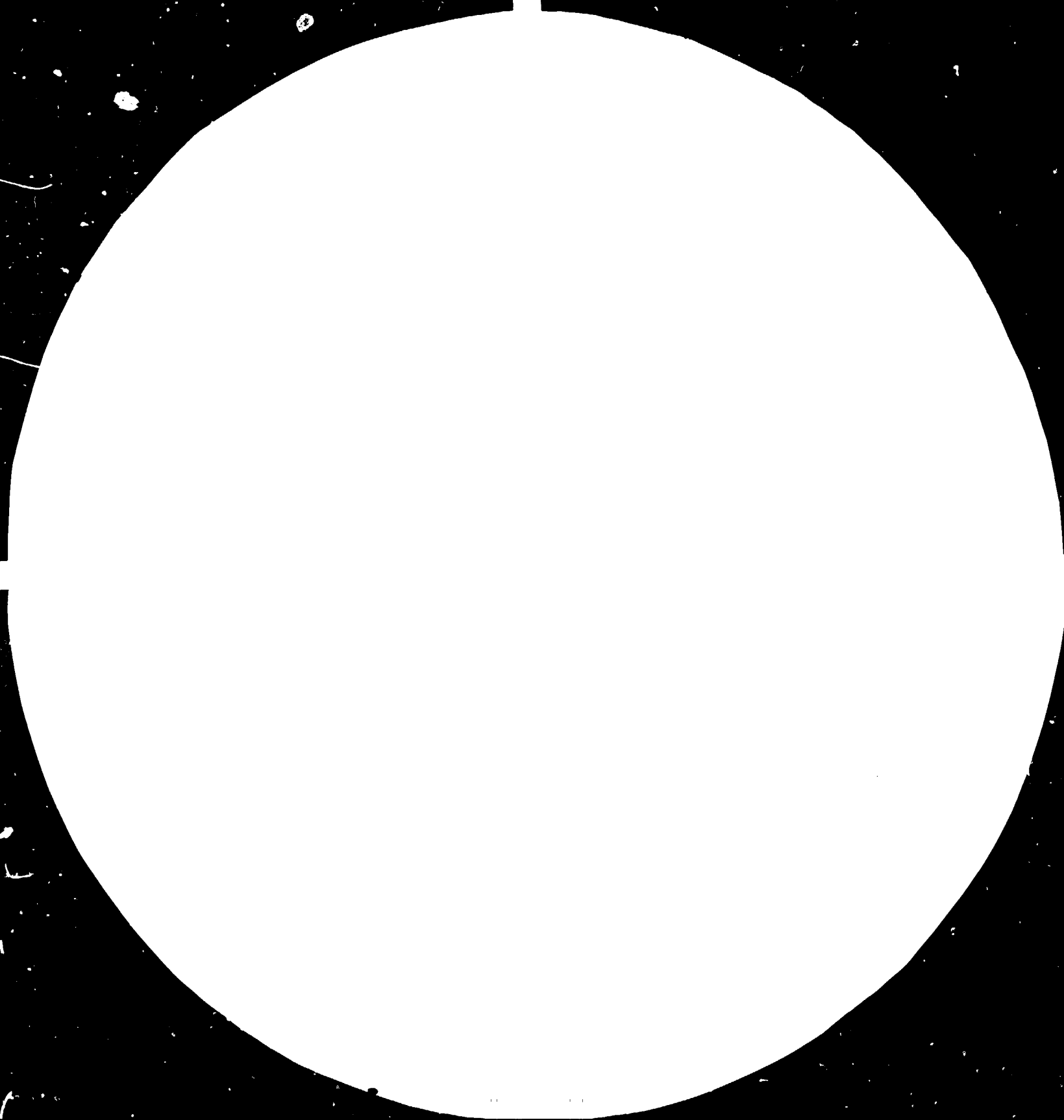
FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org





3.6

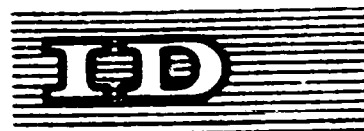
4.0



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS-
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
ANSI AND ISO TEST CHART No. 2-



11677



Distr. LIMITADA

ID/WG.300/4
22 mayo 1979

ESPAÑOL

Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial

Seminario Regional sobre Aplicaciones Industriales
de la Microbiología en la Industria Farmacéutica

La Habana (Cuba), 2 - 9 julio 1979

ESTADO ACTUAL DE LA TECNOLOGIA DE PRODUCCION
FERMENTATIVA DE SUSTANCIAS NATURALES²

por

W. Sittig²

² Las opiniones que el autor expresa en este documento no reflejan necesariamente las de la Secretaría de la ONUDI. El presente documento no ha pasado por los servicios de edición de la Secretaría de la ONUDI.

² Hoechst Aktiengesellschaft, Pharma Biochemie und Mikrobiologie H77,
6230 Frankfurt (M) 80, Rep. Fed. de Alemania.

id.79-3898

Introducción

Al margen de los grandes progresos realizados en el sector de la química moderna, la importancia de los procesos microbiológicos ha experimentado un incremento notable en el transcurso de los últimos años. Continúa la búsqueda de sustancias activas nuevas y el perfeccionamiento de las cepas de cultivo. La capacidad de los microorganismos para efectuar síntesis químicas, incluso de sustancias activas de estructura sencilla, es muy superior a los esfuerzos que realiza el hombre. Una elevada selectividad a pesar de emplear sustancias de partida sin purificar, la capacidad de adaptación a materias primas existentes en un lugar concreto y la posibilidad de incrementar el rendimiento proliferando microorganismos ya descubiertos son los factores que garantizan la superioridad de la producción microbiológica de moléculas complicadas. La mejor prueba de la rentabilidad de los microorganismos existentes en la naturaleza es el hecho de que aún hoy día se descubren sustancias nuevas desde el punto de vista biológico y se logra producirlas a escala industrial antes de llegar a conocer cada una de las fases de la síntesis. Nada tiene de extraño que los procesos de fermentación sean cada día más importantes y que esta asamblea pretenda estudiar a fondo las técnicas necesarias para ello.

Fundamentos de la fermentación aerobia

El núcleo de la fermentación aerobia a escala industrial es la célula biológica (Dib. 1). Es el reactor propiamente dicho. La instalación técnica tan enorme no hace más que proporcionar las condiciones físicas adecuadas y el aprovisionamiento necesario para la proliferación de las células y la producción de las sustancias ac-

tivas. Una de las condiciones indispensables para ello son el abastecimiento de sustratos gaseosos y líquidos, la eliminación de productos de desecho y el mantenimiento tanto de la temperatura apropiada como del pH. Por regla general se emplean procedimientos aerobios para la producción de sustancias activas. A esto se debe que yo me limite en esta disertación a hablar sólo de las fermentaciones a base de oxígeno.

Los procesos básicos trabajan por lotes, en dos fases. En el Dibujo 2 se puede observar la proliferación de los microorganismos necesarios durante uno de esos procesos y la producción subsiguiente de las sustancias activas, tras haber limitado su proliferación. Los procesos continuos o "fed-batch" suelen emplearse en los institutos de investigaciones, pero no han logrado abrirse camino en la producción industrial.

Reactores por contacto entre gases y líquidos

El fermentador aerobio consta principalmente de un reactor por contacto entre gases y líquidos. El Dibujo muestra las variantes de dichos reactores más usadas. En principio se diferencian según la clase de accionamiento y la fase continua. Los primeros fermentadores aerobios estaban formados por sistemas de superficies que permitían la proliferación de microorganismos en cultivos de agar en plantas de botellas o en cuerpos de relleno rodados de solución nutritiva, como en el caso de la obtención de ácido acético. En estos fermentadores de superficies encuentran los microorganismos naturales las condiciones de vida más adecuadas para ellos. La fermentación en suspensión, la segunda variante más importante, los ha desplazado a segundo lugar a causa de las grandes dimensiones de las instalaciones requeridas. En ciertos casos concretos no debería descartarse desde un principio el em-

pleo de estos procedimientos de superficies teniendo presente los lugares de enclavamiento y factores de costos extraordinarios. Con un proceso de producción así se pueden ahorrar muchos costos de energía.

Fermentadores de caldera agitadora

El pilar de la fermentación de antibióticos y sustancias activas es la caldera agitadora aireada mostrada en el Dibujo 4. Sin la introducción de las primeras fermentaciones en suspensión no hubiera sido posible abastecer hoy a la humanidad con antibióticos. Hay que tener muy presente que la suspensión de los hongos vinculados normalmente al suelo, las levaduras, las bacterias o los estreptomicetos en agua suponen un paso de gran trascendencia desde el punto de vista fisiológico. Nada tiene de extraño que una serie de estos microorganismos no sean capaces de pasar este proceso y aunque hayan dado origen a síntesis útiles en el laboratorio, no hayan podido emplearse en la industria.

El fermentador de caldera agitadora gaseada no ha experimentado ningún cambio externo notable en el transcurso de los últimos 30 años. No obstante, es preciso hacer constar que el volumen de los reactores ha ascendido de 40 a más de 250 m³, el cese de calor es 10 veces superior al de entonces debido a la evolución ulterior de los cultivos biológicos, la potencia de los accionamientos ha llegado a ser de 5 KW/m³ y en ciertos casos hasta 8 KW/m³. En el Dibujo 5 puede verse una tabla con los índices de las fermentaciones principales. Si tratamos de explicar estos datos de acuerdo con el estado de la tecnología de producción química, llaman la atención

1. los elevados índices de producción de los agitadores que sólo pueden descubrirse en las amasadoras o mezcladoras. Dichos ín-

dices son consecuencia de una viscosidad siempre creciente de los caldos de cultivo debida a cantidades mayores de sustancias nutritivas, a densidades de células más grandes y a un transporte de sustancias mayor requerido por parte de los cultivos.

2. las cantidades de calor a evacuar son muy elevadas si se tiene en cuenta las temperaturas de fermentación bajas que reinan en los alrededores. Por esta razón se ha procedido a acondicionar el agua refrigerante empleada normalmente para enfriar los fermentadores en instalaciones de agua fría especiales.
3. los contingentes de aireación que oscilan entre 30 y 50 m³ hora elevan considerablemente los costos de la producción.
4. la duración tan larga de las fermentaciones de cada uno de los lotes (batch) son la causa de que los costos por hora para el accionamiento del agitador, la refrigeración y la aireación, que de por sí no son muy elevados, supongan al final más de 10 % de los gastos totales.

Detalles de construcción

Como ya hemos visto, el aspecto externo del reactor sigue igual. Hoy día se efectúa la producción de una sustancia activa en un número razonable de reactores a la vez para evitar el riesgo de pérdidas por causa del paro. El nivel del líquido y consiguientemente del reactor dependerá de las fases de presión del abastecimiento de aire. Para compresores de aire monofásicos, por ejemplo, se suele usar una presión mínima de 3 bar. El diámetro del reactor está determinado, la mayoría de las veces, por el corte transversal de transporte de las calles de acceso, las vías de navegación o los puentes del tren. Por

regla general, los fermentadores van equipados de una camisa refrigeradora doble y, según la temperatura del refrigerante existente en aquel lugar, provistos de agregados refrigeradores interiores adicionales. Estos últimos tienen sus desventajas porque ocupan el volumen de producción e influyen negativamente en el rendimiento del órgano agitador. Colocando serpentines refrigerantes en las paredes externas del fermentador se aumenta su rigidez y disminuye el espesor de pared (Dibujo 6). Al principio se construían las camisas refrigeradoras de acero sencillo y las paredes del recipiente solamente de material inoxidable. Esto ocasionaba corrosiones del metal e impurezas en el agua refrigerante que a su vez, podía ensuciar las instalaciones de refrigeración de retorno. Actualmente se emplea acero inoxidable en ambos casos.

En la construcción de accionamientos de agitadores se han adoptado nuevos métodos. Como la fase de proliferación y la de la producción de sustancias activas requieren diferentes intensidades de agitación, se ha optado por regular distinto número de revoluciones para ambas fases. Hoy día existen las alternativas siguientes:

a) Motores de corriente trifásica maniobrados, modelo Thyristor.

Ventajas: manejo puramente eléctrico y mecánicamente sencillo.

Grado de eficacia: superior a un 95 %.

Desventajas: el momento de giro de impulsión desciende en función del número de revoluciones, se produce un porcentaje elevado de corriente reactiva y puede pararse el accionamiento al aumentar la resistencia.

b) Convertidores de par hidrostáticos.

Ventajas: el momento de giro de impulsión aumenta a medida que desciende el número de revoluciones, el grado de eficacia es superior

a un 93 %. El volumen de la construcción es pequeño y basta un motor de accionamiento eléctrico de pequeñas dimensiones.

Desventajas: ocasionan mucho ruido.

c) Convertidores de par hidrodinámicos.

Ventajas: construcción robusta y sencilla, el momento de giro de impulsión aumenta a medida que desciende el número de revoluciones.

Desventajas: el número de revoluciones no es constante y de él depende el grado de eficacia que comienza a descender a partir de un 93 % con un número de revoluciones nominal.

d) Acoplamiento hidrodinámico.

Ventajas: el momento de giro de impulsión y el número de revoluciones son constantes, la construcción es muy sencilla.

Desventajas: el grado de eficacia desciende linealmente con el número de revoluciones; se necesita una refrigeración con aceite.

e) Motor de accionamiento de polos conmutables con dos o tres números de revoluciones asincrónicos.

Ventajas: los costes son bajos; un pequeño aumento del momento del giro de impulsión a medida que desciende el número de revoluciones.

Desventajas: ninguna regulación continua ; el número de revoluciones puede acoplarse únicamente mediante poleas de transmisión o el cambio de ruedas dentadas cilíndricas cuando sea preciso cambiar el cultivo.

Existe la tendencia general de aumentar considerablemente la potencia de los accionamientos en relación con los datos del proyecto porque la demanda escasa de potencia por parte de los cultivos lle-

va consigo una disminución del grado de eficiencia. Pero se ha podido comprobar hasta ahora que con el mejoramiento constante de los cultivos se consigue siempre explotar posteriormente las reservas de potencia. Cuando las ventas de un producto de fermentación determinado garantizan la explotación completa de una instalación, es muy razonable emplear motores de polos conmutables.

La construcción de los pasos de árbol tiene una importancia extraordinaria por razones aeróbicas indispensables. Durante muchos años se prefirió instalar el accionamiento completo en el fondo del recipiente. Las empaquetaduras se construían como juntas de anillos deslizantes de efecto doble con superposición de cierre de agua estéril (Dibujo 8).

Estas juntas resultan caras y son sensibles a las sacudidas y vibraciones, sobre todo si se tiene en cuenta que los árboles requeridos para las grandes calderas tienen un diámetro de 200 mm. y más. Hoy día se emplea cada vez más el buen prensaestopas antiguo, perfeccionado con materiales de empaquetadura mejores y autolubrificantes. Se usa preferentemente en la cámara de gas (Dibujo 9). Para fermentadores grandes se recomienda montar los accionamientos en la parte alta de los recipientes con empaquetaduras de prensaestopas de efecto doble.

Los órganos de agitación no han experimentado ningún cambio notable en el transcurso de los últimos años. Aún sigue empleándose el agitador de discos (Dibujo 10) que se comenzó a usar a principios de la década de los cincuenta. En el Dibujo 10 se ven algunas variantes, por ejemplo el agitador autosuccionante desarrollado para la producción de ácido acético y levaduras, modelo Frings, un agitador contracorriente de varias etapas, modelo Ekato, y un agitador axial con tu-

bo conductor rotatorio. Actualmente se consideran los agitadores como bombas y se construyen con una presión y rendimiento correspondientes. Los suministradores muy poderosos le agregados agitadores están en condiciones de establecer en su planta piloto propia el agitador mejor para el sistema deseado.

Otros reactores

El fermentador de agitador gasificado es el reactor más usado en la mayoría de las producciones. Esto obedece principalmente a su gran flexibilidad, siendo capaz de fermentar incluso los caldos de cultivo más viscosos (hasta 4 pascal segundos).

Los fermentadores mostrados en los Dibujos siguientes se desarrollaron para efectuar fermentaciones especiales, tales como la obtención de esteroides, la producción de levaduras, la obtención de SCP, la clarificación de aguas de desecho y particularmente el tratamiento con lejía sulfúrica. De todos éstos solamente se puede emplear el fermentador de rueda de paletas para viscosidades muy elevadas. La mayoría de estos desarrollos están previstos para la fermentación de soluciones nutritivas muy líquidas. Es preciso resaltar de una manera especial el método tan empleado de la corriente circulante. En lugar de una mezcla homogénea de todo el contenido del reactor con una dispersión uniforme de todos los sustratos, cosa que no puede satisfacerse plenamente, se trata de conseguir (Dibujo 12) una circulación determinada de todo el contenido con un espectro muy ^{exhaustivo} de la distribución del período de circulación a través de cada zona del reactor. De esta manera puede regularse mutuamente los períodos de circulación y consumición de los sustratos alimentados.

Fermentación de sustancias activas

Hasta ahora hemos hablado de los fermentadores como reactores en suspensión generales. Sin embargo, están rodeados en toda su periferia por una serie de aparatos adicionales y sistemas de abastecimiento y regulación. Estos dependen primordialmente de la clase de sustrato y de sustancia activa formada.

Preparación de cultivos por inoculación

En el Dibujo 13 pueden descubrir el método de preparación de cultivos por inoculación hasta que llegan al fermentador. Con toda seguridad, esto no supone ninguna novedad para Vds. La cepa de producción seleccionada se transvasa de los tubitos vibratorios. Aquí se proliferan las células hasta conseguir la densidad necesaria para un cultivo de producción, pasando antes por las diferentes fases del fermentador. La preparación de los cultivos por inoculación se realiza en condiciones que fomentan la proliferación de los microorganismos pero no la producción de sustancias activas. Para poder inocular óptimamente las preparaciones de los medios nutritivos de la producción, generalmente caros, se deja proliferar una gran cantidad de cultivos en las fases pequeñas y se seleccionan los mejores. Para esto se requieren laboratorios muy grandes.

En el Dibujo 14 puede verse una vibradora moderna con 300 compartimentos para cilindros de 300 ml. de capacidad. Mientras que los modelos antiguos tenían que luchar contra grandes desequilibrios centrifugales, esta construcción lleva un contrapeso en el medio de los tres pisos para evitar así incluso las oscinaciones de volcado.

Los fermentadores pequeños (30 a 300 litros) van equipados la mayoría de las veces de accionamientos de fondo para facilitar la introducción de sondas y aparatos de medición por la tapa.

Siempre que sea posible, se prescindir hoy día de las tuberías anulares en la inoculación y se empalman los fermentadores a inocular con pavimentos sólidos (Dib. 15 caja intercambiable) o con tubos flexibles a sus prefermentadores respectivos a fin de evitar infecciones transversales. Las tuberías estarán tendidas con declive y colgadas de forma que no quede en ellas ni un charquito, pues éste puede convertirse en una sustancia seca en el transcurso del tiempo y al no ser suficientes la duración y la temperatura de esterilización, dar lugar a infecciones el día menos pensado, tal como se muestra en el dibujo 16.

La técnica de los aditivos

Según la clase de sustancia activa, los fermentadores necesitan una serie de aditivos que deben agregarse al sistema de forma estéril. Como ejemplos citemos: la solución de azúcar para la penicilina, la solución de azúcar mezclada con sulfato amónico para la tetraciclina, ácidos o lejías para regular el pH de todas las fermentaciones, con frecuencia aceites antiespumantes y naturalmente la cantidad de aire para la incubación. La esterilización se efectúa por filtración de líquidos estériles, modalidad que tropieza aún con ciertos problemas debidos a la esterilidad prolongada, y la termoesterilización. Esta última forma de esterilización es la que se viene empleando hasta hoy día, ya sea bombeando de manera estéril los preparativos de los lotes o comprimiéndolos con gas, o también esterilizando sin interrupción un cultivo no estéril a través de un trayecto caliente y refrigerante. El segundo método es el más adecuado para

Los sustratos sensibles al calor, pero, por otra parte, requiere un caudal relativamente constante para mantener el equilibrio de la transferencia de calor. El aire inyectado para la incubación se esteriliza normalmente por filtración. En el Dibujo 5 se indican las cantidades necesarias para algunos productos. Los filtros de esterilización de 0,1 a 0,2 μ m. de diámetro máximo que se ofrecen hoy día son sin duda alguna muy apropiados para las instalaciones pequeñas. Los filtros previstos para las instalaciones grandes constan de bujías filtrantes sueltas, conectadas paralelamente. Esto significa que el riesgo de paro aumenta linealmente con el volumen de la corriente de aire. Caso de fallar la esterilidad en el fermentador, es preciso examinar todas las bujías filtrantes o sustituirlas por otras nuevas. No existe una opinión unánime sobre la conveniencia de efectuar las grandes fermentaciones con los filtros de lana de vidrio muy voluminosos empleados anteriormente, que a largo plazo resultan también mucho más baratos.

Sistemas de medición y regulación

El Dibujo 4 muestra un esquema del número de sistemas de regulación que se emplean corrientemente hoy día para una fermentación en lotes. Se necesitan termostatos para la temperatura interior que, a ser posible, vayan acoplados con un regulador en cascada de la temperatura de los refrigerantes; de otra suerte pueden producirse fácilmente oscilaciones de la temperatura en el fermentador. Para equilibrar los consumos deberían medirse los caudales de aire, agua refrigerante y aditivos, y en el caso del agua refrigerante la temperatura de entrada y salida. Los aditivos se controlan estableciendo su nivel o peso, y otro tanto puede decirse respecto a los fermentadores. Siempre que sea posible, se colocan los puntos de medición en la parte sin esterilizar, delante de los filtros o inter-

cambiadores de calor. A mi juicio es indispensable la medición del volumen de oxígeno y CO_2 del aire de salida y a veces también la cantidad de sustrato volatilizado. En los fermentadores se mide el pH, el potencial redox y la cantidad de oxígeno mediante sondas. La energía absorbida por el accionamiento del agitador y el número de revoluciones facilitan datos muy valiosos para deducir la viscosidad y en consecuencia la densidad de los cultivos. Lamentablemente aún es necesario estudiar durante muchas horas de laboratorio la mayoría de los datos bioquímicamente importantes acumulados en una fermentación. Todavía no se ha conseguido una regulación del tiempo real de la densidad de las células, del volumen de enzimas y de la cantidad de sustancia activa.

Continuamente se desarrollan y ofrecen sistemas que tratan de eliminar mecánicamente la formación de espuma que se produce en condiciones desfavorables, como puede colegirse del Dibujo 18 . Pero hasta ahora no se han logrado con ellos los resultados apetecidos para espumas realmente densas. No queda más remedio que seguir empleando los aceites antiespumantes, tan odiados por los peritos en recocta. Es preciso resaltar a este respecto que con las instalaciones de antiespumación mecánica se ataca únicamente a los síntomas pero no a las causas provocantes de la espuma. Quizás pueda lograrse una solución parcial de este problema investigando más a fondo el origen de la espuma y mejorando la calidad de los medios nutritivos.

Esterilización del fermentador

Antes de iniciar una fermentación es preciso eliminar del recipiente limpiado con antelación todos los gérmenes y esporas. Existen

dos posibilidades: se vacía el recipiente, es decir, se esteriliza con un 10 % del volumen de agua, o también lleno, con todas las sustancias nutritivas dentro. En el primer caso es preciso esterilizar aparte las sustancias nutritivas que se han dosificado con anterioridad en el fermentador esterilizado. En ambos casos hay que tener presente respecto a los fermentadores propiamente dichos que todos los abastecimientos a la caldera sean purgados con vapor y se consigan las temperaturas de esterilización. La caldera con su carga de agua actúa entonces como un condensador de mezcla grande. Lo más seguro para el personal de servicio es que las tuberías de entrada y salida del fermentador estén equipadas de palpadores de temperatura en los puntos peligrosos a fin de poder controlar la esterilización. También se aconseja medir la presión en los terminales de las tuberías. La primera fase de la esterilización consiste en airear por completo todos los sistemas, ya que la esterilización se efectúa en atmósfera de vapor. Por eso hay que prescindir de racores estrechos que acumulen gas, o airearlos por separado. También son peligrosas las conexiones de vapor bifurcadas (Dibujo 19) porque no permiten controlar si el vapor pasa sin pegas por ambas tuberías.

Los racores y conexiones que no vayan a utilizarse deberían protegerse contra infecciones haciéndolas pasar por una zona caliente, como se ve en el Dibujo 20. Es preciso montar las armaduras de forma que el terminal para el fermentador sea el asiento de la válvula y el prensaestopas tan expuesto a infecciones no esté en contacto con el medio nutritivo. Según nuestra experiencia, las llaves de bola mostradas en el Dibujo 20 son los órganos de cierre menos complicados.

Condiciones especiales de fermentación

El Dibujo 21 facilita los datos de fermentación correspondientes a las sustancias activas de la penicilina G, penicilina V, estreptomina, eritromicina, tetraciclina, vitamina B 12 y amilasa. Resultaría muy prolijo hablar ahora de las diferencias de cada uno de los cultivos; por eso me limitaré a exponer los problemas principales. La adición de harina de soja, granos de almidón, extractos de levadura o harinas de maní crea ciertos problemas en la esterilización porque la temperatura debe alcanzar el núcleo de las partículas de las sustancias sólidas que siguen a la temperatura de toda la solución, como se ve en el Dibujo 22. Los aditivos de azúcar, por ejemplo para la penicilina deben esterilizarse rápidamente porque corren peligro de acaramelarse. Para ello se emplean los intercambiadores de calor expuestos en el Dibujo 23 que permiten un tiempo de retención breve con una transmisión térmica elevada y una resistencia escasa frente a los caldos líquidos muy viscosos. Además este sistema puede limpiarse fácilmente, después de quitar la tapa, cosa que no ocurre con los intercambiadores de placas o de haces tubulares.

Otro problema de naturaleza distinta se deriva de la estructura del micelo formado por microorganismos. Algunas cepas, tales como estreptomina forman micelos filamentosos que provocan rápidamente una viscosidad muy elevada, en tanto que el *Penicillium notatum*, por ej., tiende a formar "pellets" que son menos viscosos. Dado que la estructura y la extensión de la formación de antibióticos se hallan estrechamente relacionados entre sí, hay que procurar que la formación favorable del micelo no se vea inhibida, por ejemplo, por la fuerza de cizallamiento a causa del accionamiento del agitador.

La variedad de medios nutritivos crea también sus problemas. Sin duda alguna, el dato "Cornsteep liquor" facilitado en los medios nu-

tritivos del Dibujo 24 es una sustancia definida con suficiente nitidez para la bolsa de materias primas, pero no así para el explotador de fermentadores que tropieza con una sustancia que varía constantemente en su composición, según el año de la cosecha, la calidad del terreno, el país de procedencia y el plantío. Solamente la definición de agua del caño (tap water) encubre tal cúmulo de posibilidades analíticas que, según la fuente o el pozo, el agua puede contener una cantidad más o menos grande de oligoelementos o carecer de ellos.

Dificultades que lleva consigo la asunción de una licencia

De lo antedicho puede colegirse que incluso tras la entrega de las instrucciones minuciosas de servicio, por escrito u oralmente, de todos los datos principales y de la cepa, no queda garantizado el funcionamiento del proceso. Los requisitos indispensables para ello son un personal de laboratorio y de servicio muy capacitado y experimentado, en primera línea, y en segundo lugar, mucha, mucha paciencia para adaptar todos los detalles del proceso a las circunstancias locales y posibilidades técnicas.

En la tabla siguiente se exponen algunos datos principales para las sustancias activas a tratar. Se sobreentiende que las cantidades de sustancias activas indicadas se refieren al cultivo óptimo de una cepa determinada. A veces es más conveniente fermentar con cantidades inferiores de sustancias activas si con ello se consigue mejorar las condiciones de la recolta. Hay que evitar a toda costa el peligro de contaminación observando a rajatabla las condiciones de esterilización.

No cabe duda de que antibiótico de amplio espectro de acción como

la tetraciclina cuenta con muchas menos dificultades que la penicilina, por ejemplo. Por otra parte, en la producción continua, como en el caso de SCP, es preciso eliminar por lavado cierto número de gérmenes extraños colados. En definitiva, no es posible efectuar esta clase de producción sin una asepsia absoluta porque de nada sirve hacer las cosas a medias.

Respecto al origen de los cultivos es preciso decir que si bien existen explotadores de fermentaciones que conceden licencias, no falta una serie de sociedades que se han especializado directamente en conseguir una gran rentabilidad sintética de las cepas mediante procesos automáticos extensos.

En el sector de la fermentación de sustancias activas propiamente dicha no han logrado abrirse camino los procesos de producción continuos y las fermentaciones prolongadas (fed batch) solamente hasta cierto grado. Esto se debe en primer lugar al peligro de una mutación y degeneración constantes de los microorganismos que intervienen en la fermentación durante mucho tiempo, y en segundo lugar, a la baja concentración de las cosechas de los caldos de cultivo prolongados. Este último fenómeno obedece a que las soluciones de cultivos ya fermentados no se proliferan óptimamente y a veces se ven inhibidos por los productos de desecho propios. De ahí que sea necesario efectuar las cosechas con concentraciones bajas en los procesos fed-batch.

Tendencias del desarrollo biotecnológico

Los elevados costes de energía de la fermentación en calderas agitadoras han impulsado a la búsqueda de reactores que trabajen más económicamente. Ahora bien, las variantes desarrolladas hasta el

momento no han logrado conseguir la flexibilidad de las calderas agitadoras gaseadas. Pero dentro de algún tiempo se descubrirá, sin duda alguna, un reactor flexible como la caldera agitadora con una característica de corriente circulante.

Respecto a las soluciones nutritivas empleadas se acentúa la tendencia a emplear cada vez más sustratos líquidos, reducir así la viscosidad de los caldos de cultivo, y a veces conseguir síntesis mucho mejores con un consumo de energía más bajo. Este desarrollo contribuirá también al descubrimiento de reactores económicos para la fermentación.

Fundamentos de la recoleta

La posibilidad de conseguir porcentajes de sustancia activa del orden de 0,1 a 3 % peso de los caldos de cultivo depende de los requisitos que dictan la composición de los caldos cosechados. El lego en la materia parte de la idea errónea de una suspensión acuosa o una solución. Por el contrario, el Dibujo 26 muestra dos pruebas de fermentación inmediatamente después de su extracción. El cultivo es tan viscoso que después de volcar el nivel del líquido permanece perpendicular. La composición refleja todo el historial de la fermentación: la clase de cultivo por inoculación y de solución nutritiva, la clase y las cantidades de aditivos, así como el comportamiento del micelio durante la proliferación. Es preciso tener presente desde un principio que existen diferencias en la mayoría de las propiedades de los caldos cosechados, de un lote a otro, y que es preciso solucionarlos en la recoleta.

Sistematización de la recoлта

Sirvámolos de un sistema de conjunto funcional por bloques de una planta de recoлта para esclarecer las diferentes fases. Primero hay que procurar concentrar la sustancia activa en una fase y separar el micelio. En esta fase, denominada aislamiento, deben filtrarse las células, de ser ello posible. A veces hace falta desintegrar las paredes de las células que se encuentran en los cultivos para extraer de ellas una gran parte de las sustancias activas que han acumulado.

La segunda fase, denominada purificación, consiste en una serie de operaciones encaminadas a separar de la fase portante todas las sustancias adicionales. En la tercera fase se procede a la concentración de las sustancias activas hasta la separación definitiva del producto seco, ya apto para el almacenamiento. Es necesario volver a regenerar otra vez todas las sustancias auxiliares empleadas. La formación subsiguiente de derivados químicos y la preparación de las formas de aplicación no es un tema que concierne generalmente a la recoлта.

Operaciones de separación y procedimientos de desintegración

Como puede verse en el Dibujo 28 existen varios métodos de desintegración de las paredes de las células. A ser posible hay que conseguirlo sin la adición de sustancias extrañas. Por eso, hoy día se buscan con toda intensidad métodos que trabajen mecánicamente, de forma que en un futuro próximo será posible efectuar una desintegración combinada mecánico-térmica.

En la lista del Dibujo 29 se trata de diferenciarlas según un principio selectivo. El punto cardinal de la recoлта permanece la fil-

tración, encaminada a eliminar por completo el agua residual de las células. A veces es preciso un lavado posterior. En los sistemas a presión o por vacío (Dibujo 30) se encuentran unos junto a otros los filtros de compartimentos y los de tambor rotativo que pueden trabajar en condiciones perfectamente controlables. La toma de la banda es continua. Para conseguir una filtración mejor en la separación de la tetraciclina se pone una capa de precoat de gel de sílice que garantiza la filtración. La mayoría de las veces crea problemas la filtración de los micelios a causa de su ramificación tan pronunciada y la presencia de sustancias mucilaginosas como los polisacáridos. Algunas soluciones de cultivo son muy difíciles de filtrar, como por ejemplo la estreptomicina. En tal caso se las somete junto con el micelo a una extracción o adsorción.

Cuando se requieran presiones elevadas, se emplean filtros de compartimentos (Dibujo 31) que deben ser accionados a mano durante la descarga o el vaciado. Esto dificulta también la formación de la capa de precoat.

A veces la ultrafiltración tiene su importancia en la separación de las células de las bacterias de soluciones de cultivo relativamente puras, como en la obtención de encimas. En la recolta de aguas de desecho se emplean mucho los filtros de diafragma, especialmente cuando se quieren separar sales por ósmosis invertida y recuperar sustancias de alto peso molecular por diálisis. Como se sabe, la electrodiálisis no se emplea para las recoltas a escala industrial.

Tras la carga eléctrica se procede a separar mediante intercambiadores de iones, electroforesis (no a escala industrial) y procedimientos de floculación.

Los procedimientos de extracción fueron los primeros métodos de recoleta empleados con más frecuencia en la producción de anti-bióticos y han alcanzado un nivel elevado respecto a la maquinaria. No se emplean las columnas de extracción usadas corrientemente en la Química clásica a causa de su retención prolongada.

Rara vez se separa la masa celular por centrifugación porque la viscosidad elevada de los caldos permite únicamente el descenso lento de las células y en muchos casos es idéntica la densidad de las células y de los caldos.

Como norma general puede decirse que todos los métodos de separación a base de temperaturas elevadas no son adecuados para la separación de sustancias activas. Por eso se emplean solamente métodos de destilación por vacío y se prefieren métodos de secado con una retención breve.

Por último hay que llamar la atención sobre la importancia siempre creciente de los métodos de cromatografía (Dibujo X). Con el desarrollo ulterior de los materiales de soporte y de los grupos activos aumentan constantemente la selectividad, la capacidad y el abanico de aplicaciones. La irrupción de los métodos de cromatografía lleva consigo, por otro lado, que las instalaciones de recoleta se empleen cada vez más concretamente para productos especiales, mientras que los métodos clásicos a base de calderas giratorias pueden usarse todavía para varios productos.

Valoración de las operaciones de separación

Muchas veces existen diferentes métodos para conseguir los mismos objetivos. La decisión en favor de una variante se toma después de

varios ensayos realizados en la planta piloto que permiten justipreciar la calidad y la rentabilidad de la producción. La separación de las sustancias activas procedentes de la fase portadora puede efectuarse por secado, centrifugación o filtración. Los costes totales de la operación deberían ser los que deciden su rentabilidad. No obstante, como puede verse en el Dibujo 33, toda variante posee una selectividad característica de las impurezas residuales basada en los diferentes principios de separación: el procedimiento de secado elimina el material soporte volatilizado mientras que todas las impurezas permanecen en el producto, la filtración en torta retiene solamente una parte de las impurezas en el producto, en tanto que la otra se elimina junto con el filtrado. Por el contrario, en la centrifugación la separación se centra en cada uno de los núcleos de la sustancia activa y la extrae con preferencia de la fase portante, consiguiendo así la selectividad máxima. De la misma manera hay que justipreciar otros métodos, ya que cada vez son más severos los requisitos relativos a la pureza de los productos farmacéuticos.

Una empresa que se dedica a estos desarrollos debe disponer de un gran número de secadores de ensayo o efectuar secados de ensayo con sociedades especializadas para dar abasto a los muchísimos procedimientos de secado. En el Dibujo 34 se indica una lista de los secadores más usados, catalogados según la intensidad de movimiento del producto y de la forma más predominante de transmisión térmica.

Condiciones restrictivas

Desde el punto de vista del producto no se puede emplear sin más ni más cualquiera de los procedimientos especificados. Hay que tener

en cuenta de una manera especial los puntos siguientes:

La desintegración aumenta a medida que sube la temperatura.

La desintegración aumenta si perduran las condiciones desfavorables.

el pH influye en la desintegración.

La mayoría de las proteínas solubles eliminadas de toda solución de cultivo poseen un pH de solubilidad inferior, el punto isoelectrico; tan pronto como se alcance éste se precipitan las proteínas. Este fenómeno puede ocurrir por ejemplo en una centrifuga, dando origen a obstrucciones y cortes de la producción. Con frecuencia hay que efectuar toda la recolta estérilmente para que no se produzca una contaminación desde fuera ni una espolvoreación de polvo de antibióticos por todo el ambiente, cosa que es todavía más grave. Esto último se combate muy seriamente, pero a nuestro juicio no resulta tan peligroso como se había creído hasta ahora.

Recolta de sustancias activas lipófilas

Partiendo de los ejemplos expuestos en esta disertación, vamos a estudiar ahora a fondo el desarrollo de una recolta por extracción. Las fases de separación antedichas no se diferencian mucho de las de este procedimiento, si bien por razones del producto son necesarias algunas limitaciones y construcciones especiales.

Penicilinas G y V

Un diagrama del proceso de producción muestra la recolta de las penicilinas G y V empleada hoy día:

inactivación en el tanque de cosechas mediante la adición de forma-

lina, lo que inhibe también la de composición de la penicilina por falta de respiración y seguidamente la filtración mediante un filtro de tambor de cinta al vacío con un lavado simultáneo. La solución acuosa rica en penicilina se extrae de un depósito, se mezcla con humectante y se acidifica a pH 2,0 poco antes de la extracción. Durante la extracción la penicilina pasa a un disolvente unipolar, en este caso el acetato de butilo. La penicilina se precipita del disolvente con la adición de una base orgánica, la sal precipitada se pasa por una centrífuga filtrante, se vuelve a lavar y centrifugar, acabando con el secado. El producto seco ya puede almacenarse y emplearse en las síntesis químicas.

La mayor velocidad de descomposición de la penicilina se obtiene con el pH óptimo para la extracción, es decir, que la acidificación debe efectuarse muy poco antes de la extracción. Por el contrario, el producto ya es estable en la fase del disolvente.

El modelo Podbielniak (Dibujo 35) es un extractor que viene dando muy buenos resultados desde hace treinta años. Corresponde a una columna de fondo de criba polifásica montada en un campo centrifugal. Como la proteína disuelta se precipita fácilmente con el pH de la extracción y su densidad es menor que la del agua y mayor que la del disolvente, puede producirse un enriquecimiento de las proteínas en la capa de separación de ambas fases. De esta manera se interrumpe el intercambio de ambas fases y cesa la recoleta. Para evitar esto, se añade antes el humectante tensioactivo y con ello queda suspendida la proteína precipitada.

Ultimamente se separa la sal de la penicilina precipitada del disolvente mediante una centrífuga continua provista de rasqueta que

no precisa ser retirada por el personal de servicio (Dibujo 36). El producto impregnado de disolvente se escarpa automáticamente en capas delgadas de una centrifuga herméticamente cerrada y sometida a atmósfera de nitrógeno, y se transporta a un separador mediante una tubería elevadora neumática. Se calienta después el oxígeno de transporte y se emplea el tubo elevador durante el transporte como secador de corriente. El disolvente se elimina del nitrógeno por condensación y puede emplearse otra vez. También el nitrógeno se calienta de nuevo y se inyecta en la centrifuga. Este proceso patentado observa las normas de protección antiexplosiva, evita los perjuicios de la salud del personal derivados de los vapores de los disolventes y trabaja con muy pocas pérdidas. Sirva de ejemplo para corroborar que es mucho mejor estudiar en conjunto cada una de las fases del proceso para reducir de esa manera gastos y casos imprevistos.

Eritromicina

La eritromicina se separa sin filtrar el micelio con un extractor trifásico. En un separador se extrae el micelio con pH 9 de la periferia del tambor, la fase acuosa se saca con un tubo decantador y el disolvente cargado sale por el radio más pequeño (Dibujo 37). Recientemente se ha desarrollado para ello un decantador trifásico (Dibujo 38). Se extrae del disolvente con ácidos diluidos y se precipita el producto con pH 7. La purificación ulterior se efectúa por recristalización o mediante columnas de adsorción y de intercambiadores de iones. Con la decantación trifásica se logrará probablemente la simplificación de otras extracciones de antibióticos.

Tetraciclina

Una vez enfriada la solución de cultivo, se diluye con agua y se

acidifica. Seguidamente se hace pasar por un filtro de vacío provisto de una capa de precoat, se lava y se vuelve a filtrar la solución. La torta se tira. El filtrado se mezcla con sulfito sódico y la base cruda de tetraciclina se precipita con hidróxido sódico. El precipitado se separa después con la prensa filtrante. Tras haberlo amasado con agua y mezclado con ácido clorhídrico, se procede a disolverlo en acetona y agua. La purificación y decoloración se efectúan mediante la adición de productos auxiliares filtrantes y la adsorción en carbón activo. Tan pronto como se consiga una filtración clara, se precipita la base pura con NaOH. La lejía madre se separa con dos centrifugas e inmediatamente después se lava el cristalizado con acetona y agua. El producto húmedo se seca a continuación. La acetona se vuelve a recuperar de la lejía madre y de lavado. Como puede verse en el Dibujo 39, entretanto el desarrollo técnico ha descubierto filtros centrifugales que vacían automáticamente.

También escasea el personal de servicio para quitar los filtros de compartimentos empleados.

Vitamina B₁₂

Después de la fermentación los caldos se mezclan con cianuro potásico y se hierven en la caldera agitadora (Dibujo 40). Seguidamente se procede a la adsorción de la cobalamina con bentonita (antiguamente con carbón activo) y a la elución con solución acuosa de piridina. Por último se eliminan del eluato los productos de lastre con la adición de $Zn(OH)_2$, se extrae el fenol mediante extracción por contracorriente y la distribución por contracorriente con alcohol bencílico, se vuelve a extraer el fenol, adsorber con beto-

nita y separar el corrinoide de la cianocobalamina en los intercambiadores de celulosa. Tras la elución con solución acuosa de acetona, la recristalización es muy pura. Para ello se emplean los aparatos ya descritos en la recolta de antibióticos.

Recolta de sustancias activas hidrófilas

La división de las sustancias activas en sustancias polares que pueden disolverse fácilmente con disolventes no hidromiscibles y en apolares que se concentran mucho en agua, no puede mantenerse estrictamente, pero sigue empleándose. Sin duda es posible y se emplean con frecuencia los métodos de cromatografía para purificar también sustancias activas lipófilas. La estreptomycinina sirve como ejemplo para corroborar la obtención de un antibiótico hidrófilo.

Resulta casi imposible filtrar la estreptomycinina a causa de los componentes mucilaginosos que llevan los caldos de cultivo (dibujo 41). Por eso las grandes impurezas se esponjan y retienen mediante una criba y los caldos se hacen pasar a través del intercambiador de cationes débilmente ácido por contr corriente. El intercambiador se lava después con agua. La estreptomycinina se eluye después con ácido clorhídrico y se presenta en la solución acuosa como tricloruro. El eluato se purifica con carbón activo, se hace pasar otra vez por el intercambiador de iones débilmente ácido y se vuelve a eluir con ácido nítrico diluido. A continuación se procede a su neutralización con carbonato sódico y su filtración. Se adsorbe en el intercambiador de cationes y se eluye con ácido sulfúrico diluido. Este eluato se neutraliza en resina intercambiadora, se desalina en otra resina, se descolorea con carbón ac-

tivo y se filtra. Después de eliminar el agua por evaporación al vacío y precipitar el filtrado con metanol, se centrifuga, lava y seca por vacío. El rendimiento total de esta purificación es de un 70 % como máximo.

Las grandes dificultades de esta recoleta radican en las muchas fases que requiere y sobre todo en la dificultad de filtrar el micelio. Por eso es necesario agregar tanta cantidad de agua que la fase acuosa que pasa por la primera columna intercambiadora tenga un volumen tres veces mayor que el de la solución de cultivo. En el Dibujo 42 se muestra una columna intercambiadora para el sistema por contracorriente que es resistente contra las obstrucciones derivadas de las cantidades de micelio transportadas, pero también limitada en la velocidad de paso.

Respecto a las columnas intercambiadoras hay que decir que la carga tiende a hincharse durante la saturación con disolvente, lo que impulsa a construirlas para ajustar grandes presiones. Por regla general los intercambiadores se emplean para productos muy concretos y resulta casi imposible el empleo de una instalación de recoleta así para diferentes productos. Teóricamente no es posible, por lo menos hasta ahora, calcular los intercambiadores: no puede establecerse con anterioridad la capacidad, la selectividad y el reemplazo una carga. Por el contrario, no son raras variaciones de un 100 % aunque se empleen sustancias soporte y grupos activos químicamente idénticos. Sin duda alguna, los procedimientos cromatográficos se emplearán muchísimo más en lo sucesivo debido a las grandes selectividades que se consiguen con ellos.

Producción de encimas

Hablemos brevemente sobre la producción de encimas. Cada vez se emplea más la fermentación en suspensión; sin embargo, existe una serie de encimas que incluso hoy pueden producirse más económicamente sólo en medios nutritivos sólidos, siendo el principal sustrato el salvado de trigo. La fermentación en suspensión más importante con sus soluciones nutritivas complejas corresponde a la descrita en la producción de antibióticos.

Pasemos a esclarecer minuciosamente la recoleta con el ejemplo de las amilasas (Dibujo 43). Para esto hay que proceder de la manera siguiente (amilasa alfa de cultivo del *Bacillus subtilis*): proceso de absorción:

- a) Adsorción en almidón, saturado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
 - b) Elución con Na_2HPO_4 1/30 N,
 - c) Dialización del eluato,
 - d) Descoloración con resina (Duolite A2),
 - e) Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
 - f) Solución en $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ acuoso diluido de pH 10,
 - g) Diálisis,
 - h) Adición de acetona a 0%, 60 % de precipitación aprox.
 - i) Solución del precipitado en $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ acuoso de pH 10,
- Ajuste del pH a 6, liofilización.

El porcentaje de agua del adsorbente de almidón debe ser inferior a un 20 %, pues, de lo contrario, se ve atacado el mismo almidón.

Como segunda etapa le sigue la extracción (ejemplo, la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*):

- a) Extracción de la diástasis TAKA en agua,
- b) Adición de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ y filtración,
- c) Adición de agua, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- d) Centrifugación, solución del precipitado en agua,
- e) Diálisis,
- f) Adición de solución de rivanol al 1 %, filtración,
- g) Adición de rivanol al 1 %,
- h) Solución en solución de tampón de acetato (pH 6),
- i) Adición de arcilla ácida, filtración,
- j) Adición de acetona, centrifugación del precipitado,
- k) Solución en $\text{Ca}(\text{Oac})_2$,
- l) Adición de acetona y liofilización.

Todos estos procedimientos ya están establecidos y se emplean con ciertas diferencias. Sin embargo, las tendencias predominantes son la ultrafiltración fraccionada, la cromatografía en gel de sílice (no empleada aún a escala industrial) y la cromatografía por afinidad. La finalidad perseguida es la extracción directa de las enzimas del primer filtrado con una selectividad extraordinaria de los inhibidores característicos del sistema combinados con las sustancias soporte y su obtención en condiciones apropiadas.

Recolta de masas de células

Es necesaria una deshidratación mecánica y un secado del agua de la solución de cultivo completa cuando las sustancias activas se escoden total o parcialmente en células, como en el caso Flavomycin^(R), o las células mismas son el producto deseado, tal como en las proteínas unicelulares, o cuando la recolta se efectúa preferentemente del producto seco anhidro, como en el caso de la griseofulvina.

Flavomycin ^(R)

Toda la solución de cultivo se concentra en un evaporador de filtración y después se seca (Dibujo 45) en una secadora por atomización. No es necesaria una filtración previa porque casi la mitad de la sustancia activa está disuelta en la fase acuosa. Para reducir el peligro de explosión por polvo, el secador trabaja -como se ve en el dibujo- con recirculación rebajada del aire de secado y con un condensador intercalado. El calor de la evaporación proviene de la carbonación directa del ^{(petróleo con} aire y la mezcla de los gases de combustión caliente en el sistema de circulación, lo que reduce a menos de un 8 % la cantidad de oxígeno del aire. En este ambiente casi exento de oxígeno no puede inflamarse el producto seco en polvo.

Recolta de la proteína unicelular

Se emplean procedimientos semejantes a los usados en la obtención de Flavomycin. Tal como se ve en el Dibujo 46 se extrae antes la mayor cantidad posible de agua y se vuelve a inyectarla en la fermentación. Después de varios años de estudio se ha logrado concentrar las grandes bacterias de 0,5 μ m. en separadores de purificación por toberas a un 16 % de la masa celular. En las grandes instalaciones el separador concentra 40.000 l/h. de suspensión alimentada. Con el empleo de decantadores se logró, además, una concentración de la masa celular a un 30 % (Dibujo 47). El secreto consiste en apoyar la extracción del lodo de bacterias de reflujo con un nivel de líquido mayor. La máquina prevista para la producción concentra 25.000 l/h. Quedan amortizados los gastos adicionales del decantador tan pronto como se consiga con él un aumento de un 4 % de la cantidad de sustancia activa.

Metas primordiales del desarrollo futuro

Los fermentadores y en su mayor parte la recoleta no han experimentado modificaciones notables técnicas en el transcurso de las tres últimas décadas. Entretanto otros nuevos factores, como por ejemplo el encarecimiento de la energía, han obligado a nuevos empleos.

Soluciones nutritivas menos viscosas

Siguen siendo muy limitados los conocimientos sobre los medios nutritivos mejores. Un gran número de microorganismos puede sintetizarse con medios nutritivos puramente sintéticos. El ejemplo más conocido es el SCP. Sin embargo, se ha podido comprobar que en la mayoría de los casos la proliferación y el rendimiento son mejores con los medios nutritivos complejos. Se tiende, por eso, a emplear preferentemente componentes solubles a fin de conseguir cultivos más fáciles de aprovisionar y recoleccionar. Como ya se ha dicho, el mayor título de fermentación no es necesariamente el mejor título de toda la producción.

Ya en la búsqueda de cepas nuevas, que se proseguirá con métodos cada vez más automáticos, habrá de tenerse presente los medios nutritivos sintéticos. De esto se desprende el fomento del desarrollo ulterior de otros fermentadores en todo el mundo. Con toda seguridad, un fermentador moderno del año 1990 dispondrá de un caudal más definido y un consumo de energía inferior que, por ejemplo, el fermentador de caldera agitadora gaseada corriente.

En el sector de la recoleta, se emplearán preferentemente la ultrafiltración y los métodos de cromatografía además de los procedimientos clásicos perfeccionados, de una manera particular la se-

paración mecánica que en la R.F.A. está experimentando un desarrollo alentador. También se concederá mucho más importancia a la eliminación de los materiales de desecho y al nuevo empleo de los mismos.

La capacitación mejor del personal tendrá cada vez más importancia. La adquisición de know-how e instalaciones tienen sentido solamente cuando se dispone de personal calificado para explotarlas y conseguir el día de mañana unos procesos mucho mejores que los de hoy.

Vds. me propusieron un tema muy extenso. Yo he tratado de mostrarles el derrotero que siguen los desarrollos actuales a la luz de algunos ejemplos. He planteado mucho más preguntas que las que he podido responder. Espero que esta disertación les sirva de aliciente para otras discusiones ulteriores.

